VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN AN DEN RIBOSOMALEN PROTEINEN VERSCHIEDENER BAKTERIENSPEZIES

Inaugural-Dissertation
zur
zur Erlangung der Doktorwürde
des
Fachbereichs Biologie (23)
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
MARINA GEISSER
aus Berlin

Berlin 1973

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN AN DEN RIBOSOMALEN PROTEINEN VERSCHIEDENER BAKTERIENSPEZIES

Inaugural-Dissertation
zur
zur Erlangung der Doktorwürde
des
Fachbereichs Biologie (23)
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
MARINA GEISSER
aus Berlin

Berlin 1973

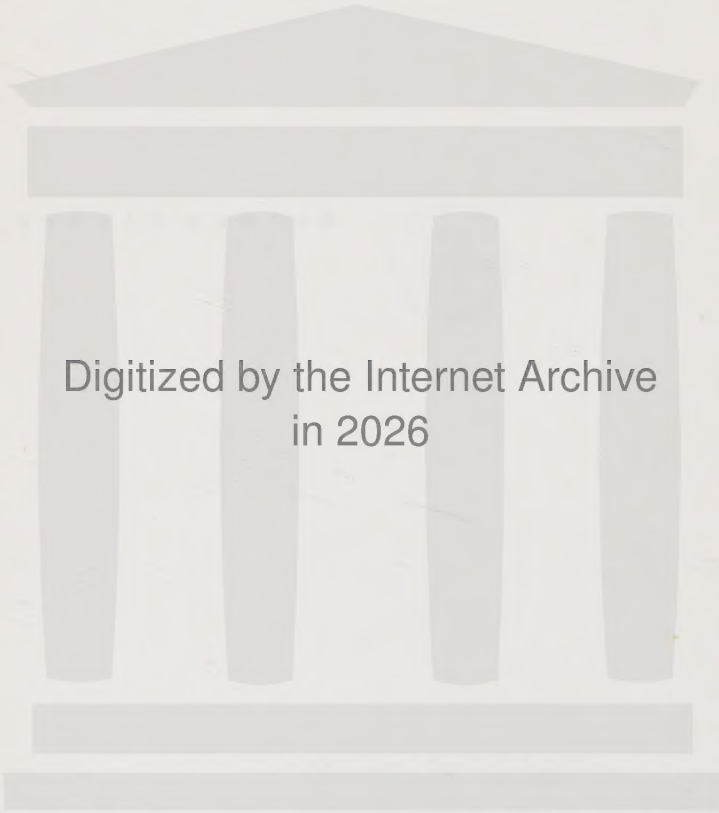
UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Referent: Dr. G. Stöffler

2. Referent: Prof. Dr. E. R. Lochmann

Tag der mündlichen Prüfung: 20. 12. 1973

Meinen Eltern


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552709_0007

Inhaltsverzeichnis

Einleitung 7

Material und Methoden 10

Ergebnisse 20

I. Allgemeine vergleichende Untersuchungen an ribosomalen Proteinen verschiedener Bakterienspezies. 20

A. Enterobacteriaceen 20

B. Pseudomonadaceen und Spirillaceen 30

C. Bacillaceen 35

Diskussion zu I 44

II. Spezielle Untersuchungen an einzelnen ribosomalen Proteinen verschiedener Bakterienspezies. 49

A. Protein "L2" 49

B. Die Proteine "L7" und "L12" 54

Diskussion zu II 60

Zusammenfassung 63

Literaturverzeichnis 64

Danksagung 72

Lebenslauf 73

Anhang: Abbildungen 74

Abkürzungen

AEPS	Antieinzelproteinserum
ATP	Adenosintriphosphat
B.	Bacillus
E.	Escherichia
EF-G	Elongationsfaktor G
Fab	antikörperbindendes Fragment
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
IgG	Immunglobulin G
Phe	Phenylalanin
POPOP	1,4-bis-2-(5 Phenyloxazolyl) Benzene
PPO	2,5-Diphenyloxazole
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulphat
RNA	Ribonucleinsäure
TCA	Trichloressigsäure
Upm	Umdrehungen pro Minute

Einleitung

Seit bekannt wurde, daß das Ribosom eine zentrale Rolle bei der Proteinbiosynthese spielt, wurden grundlegende Erkenntnisse über Struktur und Funktion des Bakterienribosoms gewonnen (eine Übersicht vermitteln folgende Arbeiten: Kurland 1972; Wittmann und Stöffler 1972; Nomura 1973). Die meisten Erkenntnisse wurden bislang an Ribosomen von E.coli gewonnen.

Das Bakterienribosom sedimentiert mit 70S und zerfällt bei Erniedrigung der Mg^{++} Konzentration in zwei ungleiche Untereinheiten, ein 30S und ein 50S Partikel. Die kleine Untereinheit besteht bei E.coli aus einer etwa 1700 Nucleotide langen 16S RNA und 21 Proteinen. Die größere Untereinheit dagegen enthält 34 Proteine und zwei RNAs, von denen die eine mit 5S und die andere mit 23S sedimentiert. Die Sequenzen der 16S RNA wurden bisher fast und die der 5S RNA vollständig ermittelt (Brownlee und Sanger 1967; Fellner et al. 1972; Ehresmann et al. 1972), während die Sequenz der 23S RNA bisher nur zum Teil aufgeklärt wurde (Fellner 1971). Die Charakterisierung der ribosomalen Proteine führte in einigen Fällen bis zur Kenntnis der vollständigen Aminosäuresequenzen (Terhorst et al. 1972; Terhorst et al. 1973; Reinbolt und Schiltz 1973).

Traub und Nomura (1968) gelang es als ersten, aus den ribosomalen Einzelkomponenten in vitro ein funktionell aktives 30S Ribosom zu synthetisieren. Aus Rekonstitutionsversuchen konnten wertvolle Schlüsse über den Aufbau des Bakterienribosoms und die gegenseitigen Wechselwirkungen der einzelnen Komponenten gezogen werden (Mizushima und Nomura 1970), und in direkten Bindungsexperimenten wurde gezeigt, welche der ribosomalen Proteine direkt an die 16S bzw. 23S RNA binden (Stöffler et al. 1971a).

An antibiotikaresistenten Stämmen wurde das Verhalten zahlreicher Antibiotika am Bakterienribosom studiert (Birge und Kurland 1969; Ozaki et al. 1969). Kischa et al. (1971) konnte die ribosomen-

abhängige GTPase Reaktion den ribosomalen Proteinen L7/L12 zuordnen, und durch die Wechselwirkung von Antikörpern mit ribosomalen Einzelproteinen wurde die Lage der ribosomalen Proteine am Bakterienribosom näher bestimmt (Stöffler et al., im Druck). Vernetzungsexperimente mit bifunktionellen Reagentien geben außerdem eine Möglichkeit, die Nachbarschaftsverhältnisse bei den ribosomalen Proteinen zu klären. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, daß der Abstand zwischen den ribosomalen Proteinen S18 und S21 als auch zwischen S5 und S8 nicht mehr als 10 Å beträgt (Lutter et al. 1972).

In verstärktem Maße werden zur Erforschung der Struktur und Funktion des Bakterienribosoms andere Bakterienspezies als E.coli herangezogen. Schon früh zeigte sich, daß die Basenzusammensetzungen der ribosomalen RNAs sehr wenig variiert. Bei mehreren getesteten Bakterien lag der GC-Gehalt bei ca. 50-55% (Miura 1962; Midgeley 1962). So ist es nicht verwunderlich, daß die RNA Sequenzen der 5S RNA von Pseudomonas fluorescens (Larsen et al. 1970) und der 16S RNA von Proteus vulgaris (Ehresmann et al. 1972) zum Teil große Übereinstimmungen mit den entsprechenden RNAs von E.coli aufweisen.

Untersuchungen in der eindimensionalen Stärkegelelektrophorese (Waller 1964) zeigten für die ribosomalen Proteine verschiedener Bakterienspezies große Unterschiede in der elektrophoretischen Wanderung. Otaka et al. (1968) benutzte die säulenchromatische Auftrennung ribosomaler Proteine zum taxonomischen Vergleich von Bakterien. So weisen die ribosomalen Proteine miteinander nahe verwandter Enterobacteriaceen ganz ähnliche Proteinmuster auf, während sich die Bacillaceen von den Enterobacteriaceen und auch untereinander wesentlich in ihren ribosomalen Proteinen unterscheiden (Osawa et al. 1971; Otaka et al. 1968). Sun et al. (1971) dagegen zeigte durch eindimensionale Polyacrylamid Gel Elektrophorese in Gegenwart von SDS, daß die ribosomalen Proteine entfernt verwandter Bakterien zumindest im Molekulargewicht gut übereinstimmen.

Die Einführung der zweidimensionalen Gelelektrophorese (Kaltschmidt und Wittmann 1970) gibt uns die Möglichkeit, die ribosomalen Proteine in einem Schritt fast vollständig aufzutrennen. Deshalb ist diese Methode für vergleichende Untersuchungen ribosomaler Proteine besonders geeignet.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, die ribosomalen Proteine verschiedener Gruppen von Bakterien, insbesondere der Enterobacteriaceen und der Bacillaceen, auf der zweidimensionalen Gelelektrophorese zu untersuchen und die Frage zu klären, ob einzelne Proteine oder Proteingruppen während der Evolution bevorzugt konserviert wurden. In diesem Zusammenhang waren neben den elektrophoretischen Untersuchungen immunologische Methoden besonders wertvoll.

Während eine Zuordnung einzelner Proteine mittels der zweidimensionalen Gelelektrophorese meist nur bei nahe verwandten Bakterienspezies möglich ist, sollten außerdem mit weiterführenden Methoden die zu E.coli L2 und L7/L12 homologen Proteine in verschiedenen Bakterienspezies charakterisiert werden. Der Vergleich dieser Proteine sollte die Möglichkeit geben, mehr Erkenntnisse über Struktur und Funktion der ribosomalen Proteine zu sammeln.

Material und Methoden

1. Verwendete Puffer

TMA I	Tris-HCl	10^{-2} M	pH 7,8
	$MgCl_2$	10^{-2} M	
	NH_4Cl	3×10^{-2} M	
	Mercaptoäthanol	6×10^{-3} M	
TSM I	Tris-HCl	10^{-2} M	pH 8,0
	Bernsteinsäure	3×10^{-3} M	
	$MgCl_2$	10^{-2} M	
Dissoziationspuffer			
	$MgCl_2$	10^{-3} M	pH 7,5
	Kaliumphosphat	10^{-2} M	
	Mercaptoäthanol	5×10^{-3} M	
Standardpräzipitationspuffer			
	Tris-HCl	5×10^{-2} M	pH 8,2
	LiCl	5×10^{-1} M	
TMA III spez.			
	Tris-HCl	5×10^{-2} M	pH 7,5
	$Mg(CH_3COO)_2$	$1,4 \times 10^{-2}$ M	
	KCl	6×10^{-2} M	
	EDTA	$2,5 \times 10^{-4}$ M	
	Mercaptoäthanol	6×10^{-3} M	
Natrium-Veronalpuffer			
	Barbital-Natrium	$1,9 \times 10^{-2}$ M	pH 8,6
	$Na(CH_3COO)$	$1,9 \times 10^{-2}$ M	
	HCl	$3,3 \times 10^{-3}$ M	
Waschpuffer			
	Tris-HCl	10^{-2} M	pH 7,4

NH_4Cl	$2,8 \times 10^{-2}$ M
$Mg(CH_3COO)_2$	10^{-2} M
Fusidinsäure	10^{-5} M

2. Bakterienstämme und Zuchtbedingungen

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Stämme und ihre Zugehörigkeit zu Familien und Ordnungen sind in Tabelle 1 aufgeführt. Sofern in Tabelle 1 keine andere Temperatur angegeben ist, wurden die Stämme bei 37° C gezogen. Alle aeroben Bakterienstämme wurden in Vollmedium (0,8% Nutrient Broth; 0,4% NaCl; 1,5% Glukose; oder 0,75% Yeast Bacto; 0,75% Pepton; 0,5% NaCl; 0,1% Na_2HPO_4) im Fermenter (Magnaferm der Firma New Brunswick Scientific) oder in 5-l Erlenmeyer-Kolben gezogen. Die anaeroben Clostridien wurden unter Stickstoff in 3,8% RCM Medium (Oxoid Limited) gezogen und wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Katzares zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in der späten log-Phase durch Zentrifugation geerntet und einmal mit TMA I gewaschen. Bis zur Aufarbeitung wurden die Zellen bei -20° C aufbewahrt.

3. Ribosomenaufarbeitung

Die Ribosomenaufarbeitung erfolgte mittels fraktionierter Zentrifugation. Die gesamte Aufarbeitung erfolgte bei 4° C. Insbesondere zwei Methoden wurden angewandt, um Ribosomen zu erhalten, die frei von Überstandsenzymen sind: Entweder wurden die Ribosomen nach dem 1. Ultrazentrifugenschritt zweimal mit TSM I 0,6 M $(NH_4)_2SO_4$ gewaschen (Hardy und Kurland 1966), oder die Zentrifugenröhrchen wurden bei den beiden letzten Ultrazentrifugenschritten zu 1/3 mit 1 M Rohrzucker in TMA I unterschichtet. Unter diesen Bedingungen wurde die Zentrifugationsdauer in der Ultrazentrifuge um 50% erhöht.

4. Trennung von 50S und 30S Untereinheiten

70S Ribosomen wurden 3 mal für 6 Stunden gegen Dissoziationspuffer dialysiert. Die Trennung erfolgte durch einen Sucrosegradienten entweder im Zonalrotor B XV (Beckmann Instruments) nach Hindennach et al. (1971) oder im Beckmann Schwingrotor SW 27 (16 h bei

20.000 Upm). Die 30S und 50S Untereinheiten wurden bei -70° C aufbewahrt.

5. Extraktion der ribosomalen Proteine

a. Extraktion mit 67% Essigsäure (Hardy et al. 1969). Ribosomen in einer Konzentration von 10-15 mg/ml wurden auf Eis mit 1/10 des Volumens von 1 M $MgCl_2$ versetzt und anschließend mit Eisessig auf 67% Essigsäurekonzentration eingestellt. Die löslichen Proteine wurden von der ribosomalen RNA durch Zentrifugation (30 min bei 16.000 Upm im Sorvall Rotor SS-34) getrennt. Der die ribosomalen Proteine enthaltende Überstand wurde 2 mal gegen 10% ige Essigsäure, 1 mal gegen 1% ige und 2 mal gegen 0.5% ige Essigsäure dialysiert. Danach wurde das Protein lyophilisiert und bis zur Verwendung bei -20° C in Anwesenheit von Silicagel aufbewahrt.

b. Extraktion mit 4 M Harnstoff und 2 M LiCl (Leboy et al. 1964). Ribosomenlösung mit einer Konzentration zwischen 10-25 mg/ml wurde auf Eis mit einem gleichen Volumen von 8 M Harnstoff 4 M LiCl versetzt und 48 h auf Eis gehalten. Dabei präzipitiert 23S und 16S RNA sowie ein Teil der 5S RNA, während die ribosomalen Proteine in Lösung bleiben. Die Trennung erfolgte durch 30 min Zentrifugation bei 16.000 Upm. Für immunologische Teste war keine weitere Behandlung der Proteinlösung nötig. Um LiCl-Harnstoff extrahierte Proteine auf der zweidimensionalen Gelelektrophorese aufzutrennen, wurde die Proteinlösung wie bei der Essigsäureextraktion gegen Essigsäure dialysiert und anschließend lyophilisiert. Das Sediment der ribosomalen RNA wurde in Aqua bidest gelöst, gegen TMA I dialysiert und entweder bei -20° C eingefroren oder direkt weiterverarbeitet (s. Isolierung des Proteins "L2").

6. Zweidimensionale Gelelektrophorese (Standardmethode).

Die Ausführung folgte der Methode von Kaltschmidt und Wittmann (1970 a). Folgende Mengen wurden aufgetragen: 2 mg Protein aus 70S Ribosomen, 1,0 - 1,5 mg aus 50S Untereinheiten oder 0,8 - 1,2 mg aus 30S Untereinheiten. In der 1. Dimension war die

Tabelle 1: Die Klassifizierung der in dieser Arbeit benutzten Stämme nach Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1957).

Ordnung	Familie	benutzte Stämme	
Pseudomonadales	Pseudomonadaceen	Aeromonas punctata	
		Plesiomonas shigelloides	
	Spirillaceen	Vibrio cuneatus	(30°C)
Eubacteriales	Enterobacteriaceen	Escherichia coli A19	
		Escherichia freundii	
		Aerobacter aerogenes	
		Klebsiella pneumoneae	
		Erwinia carotovora	
		Serratia marcescens	(30°C)
		Proteus vulgaris	
		Salmonella typhimurium	
		Shigella dispar	
	Bacillaceen	B.subtilis 168	
		B.stearothermophilus 799	(65°C)
		B.pumilis ATCC 7061	(30°C)
		B.circulans ATCC 4513	(30°C)
		B.coagulans ATCC 7050	
		B.brevis ATCC 9999	
		B.cereus	
		B.megaterium	
		B.licheniformis	
		Clostridium perfringens Typ A	
		Typ B	
		Typ C	
		Typ D	
		Typ E	
		Typ H	
		Clostridium septicum	
		Clostridium sporogenes	
		Clostridium pasteurianum	
		Clostridium butyricum	

Acrylamidkonzentration meist 8%, in der 2. Dimension stets 18% (Kaltschmidt und Wittmann 1970 b). Die Laufzeit in der 1. Dimension betrug 39 h bei 78 Volt. In der 2. Dimension dauerte die Laufzeit 22 - 24 h bei 105 Volt. Die Gelplatten wurden mit Amidoschwarz (550 mg pro 1l 7,5% ige Essigsäure) gefärbt. Dann wurde zunächst für 1 - 2 h unter laufendem Wasser und danach in 1% iger Essigsäure entfärbt.

7. Zweidimensionale Gelelektrophorese in Gegenwart von SDS.
Die SDS-zweidimensionale Gelelektrophorese folgte wenig modifiziert der Vorschrift von Martini und Gould (1971). 2 - 3 mg 70S ribosomales Protein bzw. 1,5 - 2 mg ribosomales Protein aus den Untereinheiten wurde aufgetragen. Die 1. Dimension wurde nach Kaltschmidt und Wittmann (1970 b) mit 4% iger Acrylamidkonzentration durchgeführt. Nach 24 h Elektrophorese wurden die eindimensionalen Gele bei 37° C je 45 Minuten gegen folgende Puffer dialysiert: a) 0,1 M Natrium-Phosphat-Puffer pH 7,1; 1% SDS; 8 M Harnstoff; 0,58 mM Mercaptoäthanol; b) 0,01 M Natrium-Phosphat-Puffer pH 7,1; 1% SDS; 8 M Harnstoff; 0,58 mM Mercaptoäthanol; c) 0,01 M Natrium-Phosphat-Puffer pH 7,1; 0,01% SDS; 8 M Harnstoff; 0,58 mM Mercaptoäthanol.

Die zweite Dimension erfolgte in 0,05 M Natrium-Phosphat-Puffer bei pH 7,1. Das Gel enthielt 200 g Acrylamid pro 2000 ml; 6,6 g N,N' Methylenbisacrylamid (Serva, Deutschland); 2 g SDS; 2 ml N,N,N',N' - Tetramethylaethylendiamin (Fluka, Schweiz). Als Referenz wurden pro Gel 50 µl 0,05% Bromphenolblau aufgetragen. Die Laufzeit betrug 20 - 24 h.

Die Gelplatten wurden für 24 h mit 0,1% Coomassieblau, 10% iger Essigsäure und 50% Methanol gefärbt. Die Entfärbung dauerte 3 - 5 Tage und erfolgte mit 10% iger Essigsäure und 10% Methanol.

Zur Errechnung von Molekulargewichten wurden als Referenzproteine die ribosomalen Proteine von E.coli benutzt (siehe Ergebnisse). Da die 1. Dimension in Standard zweidimensionaler Gelelektro-

phorese und in SDS zweidimensionaler Gelelektrophorese identisch sind, war eine Zuordnung der einzelnen ribosomalen Proteine der SDS zweidimensionalen Gelelektrophorese zu denen der Standard zweidimensionalen Gelelektrophorese fast immer möglich. Die Wanderungsgeschwindigkeit wurde nach folgender Formel errechnet:

$$\text{Wanderungsgeschwindigkeit} = \frac{\text{Wanderungsstrecke des Proteins}}{\text{Wanderungsstrecke der Front}}$$

Die Wanderungsgeschwindigkeit der ribosomalen Proteine wurde gegen ihr Molekulargewicht (Dzionara et al. 1970) halblogarithmisch aufgetragen (Abb. 1). An Hand dieser Standardkurve konnten die Molekulargewichte der ribosomalen Proteine anderer Bakterienspezies errechnet werden.

8. Immunologische Methoden

a. Immunisierungsmethoden. Mischrassige Kaninchen, 2 - 4 kg Körpergewicht wurden intracutan und intramuskulär an mindestens zehn verschiedenen Körperstellen injiziert. Vor der Erstinjektion wurde jedem Tier Blut abgenommen und als Kontrollserum bei -20° aufbewahrt. Drei verschiedene Adjuvantien wurden benutzt: 1) Incomplete Freund's Adjuvant (Difco Labs, Detroit, Michigan); 2) Complete Freund's Adjuvant (Difco Labs); 3) Natrium Alginat (Medical Alginates Ltd., Greenford, England).

Antiseren wurden hergestellt 1) gegen 70S Ribosomen von E.coli und B.subtilis; 2) gegen ribosomale Einzelproteine von E.coli; 3) gegen das ribosomale Protein "L2" von B.stearothermophilus. Die Gewinnung, Charakterisierung und eventuelle Reinigung von Anti E.coli Einzelproteinseren (AEPS) wurde von Stöffler und Wittmann (1971a,b) ausführlich beschrieben.

b. Immunpräzipitationsteste (Heidelberger 1939; Kabat 1961) mit AEPS wurden mit LiCl-Harnstoff extrahiertem Protein in Standardpräzipitationspuffer durchgeführt. Das Ansatzvolumen von 1 ml enthielt 200 µg gesamtribosomales Protein und steigende Mengen Antiserum (0,1 ml; 0,3 ml; 0,5 ml). Die Bestimmung des Präzipitats erfolgte nach Lowry et al. (1951).

Präzipitationsteste mit intakten Ribosomen wurden in TMA III spez. durchgeführt. Die Ribosomenkonzentration betrug 8 OD_{260} pro Testansatz. Da intakte Ribosomen auch rRNA enthalten, wurde im Präzipitat neben dem Proteingehalt auch der RNA-Gehalt mittels Orcin (Mejbaum 1939) bestimmt. Zur Auswertung der Präzipitationsteste wurden jedoch stets die Folinwerte verwendet, um einen Vergleich mit Präzipitationstesten, in denen ausschließlich ribosomales Protein eingesetzt wurde, zu ermöglichen.

c. Doppeldiffusionsteste wurden nach Ouchterlony (1968) in eckigen (88 mm x 88 mm) Plastikpetrischalen (Lab-Tek Products, Westmont, Illinois) mit 25 ml 1,5% iger Agarose (Behringwerke, Marburg) durchgeführt. Als Puffer wurde ein Natrium-Veronalpuffer pH 8,6; 0,075 M LiCl verwendet. Allen Puffern wurden 0,02% Cialit (ASIS-Institut, München) zur Verhinderung von Bakterienwachstum zugesetzt.

Die Diffusionsteste wurden hauptsächlich in der Semimikromethode durchgeführt. Der Abstand der Löcher betrug 4 mm; 40 - 100 µl Antiserum und 60 - 300 µg Antigen wurden pro Loch eingefüllt. Vor Beginn einer Testserie wurde in Vorversuchen sichergestellt, daß Antigen und Antikörper möglichst in Äquivalenz waren.

9. Isolierung des ribosomalen Proteins "L2".

Die durch Extraktion der ribosomalen Proteine mit 4 M Harnstoff und 2 M LiCl erhaltene rRNA (s.S. 12) wurde nochmals mit dem gleichen Volumen 8 M Harnstoff 4 M LiCl versetzt und 48 h auf Eis inkubiert. Die präzipitierte RNA wurde abzentrifugiert (30 min bei 4000 Upm), in Aqua bidest gelöst und gegen TMA I dialysiert. Die Proteine, die unter diesen Bedingungen nicht von der RNA dissoziiert waren, wurden mit 67% iger Essigsäure in Gegenwart von 0.34 M Mg^{++} extrahiert (Hardy et al. 1969). Die Reinigung der Proteine erfolgte auf einer Sephadex G100 Säule (Durchmesser 2 cm; Länge 120 cm; Sephadex der Firma Pharmacia, Schweden). Der Elutionspuffer enthielt 6 M Harnstoff; 0,3 M LiCl; 0,01 M Mercaptoäthanol bei pH 6,5. Die optische Dichte der Fraktionen wurde bei 230 nm

und 260 nm gemessen, die Proteingipfel geschnitten, gegen 1% ige Essigsäure dialysiert, lyophilisiert und anschließend in Standard zweidimensionaler Gelelektrophorese auf ihren Proteingehalt untersucht.

10. Aminosäureanalyse.
Die Proteine wurden in 6 N destillierter HCl und 2% Mercaptoäthanol unter Stickstoff für 20 h bei 110° C hydrolysiert und das Lösungsmittel anschließend im Vakuumrotationsverdampfer möglichst schnell beseitigt (Blackburn 1968).

Die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung erfolgte in einem automatischen Aminosäureanalysator der Fa. Biocal Instruments (München). Die Extinktion der quantitativen Ninhydrinreaktion wurde für jede einzelne Aminosäure automatisch gemessen und von einem Punktschreiber registriert. Zur Berechnung wurde die Extinktionskurve jeder Aminosäure integriert: Der eine Parameter, die Höhe, kann dafür abgelesen werden. An Stelle der Vermessung des 2. Parameters, der Halbwertsbreite in der Extinktionskurve, wird die Zeit als Funktion der Halbwertsbreite eingeführt. Die Zeit kann durch einfaches Abzählen der Punkte über der halben Höhe ermittelt werden, wodurch die Auswertung wesentlich vereinfacht wird. An Hand einer Eichkurve mit bekannten Aminosäuremengen konnte für jede Aminosäure der Molanteil berechnet werden (Braunitzer 1960). Folgende Korrekturen wurden wegen unvollständiger Hydrolyse oder Zerfall einiger Aminosäuren gemacht: Serin 10%, Threonin 5%, Valin 5%, Isoleucin 10%, Tyrosin 15%. Tryptophan und Cystein wurden nicht bestimmt (Kaltschmidt et al. 1970b).

11. Herstellung der Enzymfraktion für die Poly-U abhängige Poly-Phe Synthese (modifiziert nach Traub und Zillig 1966).
Bei der Ribosomenaufarbeitung befinden sich nach dem 1. Ultrazentrifugenschritt die benötigten Enzyme im Überstand. Die oberen 2/3 des Überstandes wurden auf Eis unter gelegentlichem Rühren mit TMA I äquilibrierter DEAE (DE 32 von Whatman, England) für 1/2 h inkubiert. Die so behandelte DEAE wurde auf einer Fritte mit TMA I gewaschen, in eine Säule gefüllt und die Enzyme mit TMA I, 0,05 M

NH_4Cl eluiert. Die Messung der optischen Dichte (OD_{260}, OD_{280}) erübrigte sich dabei meist, da die gelb-braune Färbung des Enzymgipfels mit bloßem Auge gut zu erkennen war. Die Fraktionen wurden geschnitten, vereinigt und in kleinen Portionen bei -70° C eingefroren.

12. Poly-U abhängige Poly-Phe Synthese (Nirenberg und Matthaei 1961)
Die Poly-U abhängige Poly-Phe Synthese wurde in einem Gesamtvolumen von 0,1 ml durchgeführt, wodurch es möglich ist, mit minimalen Mengen an Material auszukommen.

Jeder Test wurde in folgender Weise und Reihenfolge angesetzt: 20 µl Mix I; 20 µl Mix II; 20 µl Enzymfraktion; 20 µl Ribosomenlösung (4 OD_{260}/ml); 20 µl (^{14}C) Phe-Lösung. Mix I enthielt 120 mM Tris HCl pH 7,6; 67 mM $Mg(CH_3COO)_2$; 250 mM $(NH_4)_2SO_4$. Bei Zugabe von IgG wurde dieses in der entsprechenden Konzentration in Mix I gelöst. Mix II enthielt 1,6 mM GTP Na_3 (Boehringer, Mannheim); 3,35 mM ATP Na_3 (Boehringer); 250 mM Phosphoenolpyruvat (Boehringer); 2 mg Poly U /ml (Boehringer); 0,2 mg Pyruvatkinase pro ml . Der pH von 7,6 wurde mit 0,5 N KOH eingestellt. Der Enzymfraktion wurde t-RNA von E.coli B (Schwarz Bioresearch, USA) zugegeben. Für jede Enzympräparation mußte die benötigte Menge an Überstandsenzymen und t-RNA durch Optimierungskurven neu bestimmt werden. Die (^{14}C) Phe-Lösung enthielt 16,7 µM (^{14}C) Phe /ml (New England Nuclear, USA) mit einer spezifischen Aktivität von 375 µC/mM sowie 16,7 µM unmarkiertes (L)-Phenylalanin /ml (Merck, Darmstadt).

Nach Zugabe des (^{14}C) Phe wurden 10 µl als Nullwert abgenommen und die Poly-U abhängige Poly-Phe Synthese durch Inkubation im Wasserbad bei 37° C gestartet. Alle 10 min wurden 10 µl entnommen und sofort in 10% iger Trichloressigsäure (TCA) bei 0° C auf Fiberglasfiltern fixiert (Schleicher und Schüll, Deutschland). Die Filter wurden 10 min bei 90° C in 5% iger TCA gewaschen und dann nacheinander je 1 min mit 1) 5% iger TCA; 2) 5% iger TCA; 3) Äther-Alkohol-Gemisch im Verhältnis 1:1; 4) dito; 5) Äther nachbehandelt. Die trockenen Filter wurden mit je 0,5 ml Soluene (Packard Instruments, USA) für 2 h inkubiert, und die Proben nach Zugabe

von jeweils 10 ml Scintillatorlösung (0,4 g POPOP und 7 g PPO von Packard auf 1l Toluol) im Scintillationszähler der Fa. Nuclear Chicago gezählt.

13. Abspaltung der Proteine "L7/L12".
Von Hamel et al. (1971) wurde eine selektive Abspaltung der ribosomalen E.coli Proteine L7/L12 mit 1 M NH_4Cl und Äthanol beschrieben. Die 70S Ribosomen von Plesiomonas shigelloides, B.subtilis, B. pumilis und B.stearothermophilus wurden in der gleichen Weise mit Äthanol und NH_4Cl behandelt, die daraus resultierenden Überstandsenzyme wurden als PI-Proteine, die gefällten Ribosomen als PI-Partikel bezeichnet. Dabei werden neben "L7/L12" zum Teil noch zusätzliche Proteine abgespalten. Dies sind jedoch fast ausschließlich 30S Proteine, die für die EF-G-abhängige GTP-Bindung keine Rolle spielen.

14. EF-G-abhängige GTP-Bindung.
Die ribosomalen Proteine L7/L12 spielen eine wichtige Rolle für die EF-G-abhängige GTP-Hydrolyse (Kischa et al. 1971) sowie für die EF-G-Ribosom-GDP Komplexbildung (Highland et al. 1971). Das Antibiotikum Fusidinsäure stabilisiert den Komplex aus 50S Untereinheit G-Faktor und GDP, woraus Bodley et al. (1969) einen Test entwickelten, der die EF-G-abhängige GTP-Bindung mißt.

Die Teste wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl in folgendem Puffer durchgeführt: 10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 10 mM NH_4Cl; 10 mM $Mg(CH_3COO)_2$; 0,1 mM Dithiotreitol. Jeder Testansatz enthielt 3 mM Fusidinsäure (Fa. Squipp), 30 µg Ribosomen, 10^{-6} M (^{3}H) GTP und je nach Bedarf steigende Mengen an IgG oder Fab. Der gereinigte G-Faktor wurde freundlicherweise von Herrn Bodley zur Verfügung gestellt, die benötigte Menge mußte für jede Charge neu bestimmt werden. Bei Versuchen mit Antikörpern wurden diese zunächst mit den Ribosomen bei 0° C vorinkubiert. Gestartet wurde der Test durch Zugabe von (^{3}H) GTP. Nach 5 min Inkubation wurden die Testgemische auf Milliporefiltern gefiltert, 3 mal mit Waschpuffer gewaschen und unter einer Lampe getrocknet. Die Filter wurden mit 5 ml Scintillatorlösung im Scintillationszähler gezählt.

Ergebnisse

I. Allgemeine vergleichende Untersuchungen an ribosomalen Proteinen verschiedener Bakterienspezies.

A. Enterobacteriaceen.

Nach Bergey (1957) gliedert sich die Familie der Enterobacteriaceen in fünf Unterfamilien (tribe): Escherichieae, Erwinieae, serratieae, Proteeae und Salmonelleae. Die Erwinieae, Serratieae und Proteeae besitzen nur jeweils eine Gattung. Die Salmonelleae teilen sich in die Gattungen Salmonella und Shigella, während die Escherichieae fünf Gattungen aufweisen: Escherichia, Aerobacter, Klebsiella, Paracolobactrum und Alginobacter.

1. Zweidimensionale Gelelektrophorese.

Die ribosomalen Proteine von E.coli, Shigella dispar, Salmonella typhimurium, Aerobacter aerogenes, Escherichia freundii, Erwinia carotovora, Serratia marcescens, Proteus vulgaris und Klebsiella pneumoneae (Ergebnisse nicht aufgeführt) wurden mit Essigsäure extrahiert und in der zweidimensionalen Gelelektrophorese aufgetrennt (Abb. 2 und 3). Von E.coli, Aerobacter aerogenes, Erwinia carotovora und Serratia marcescens wurden Proteine aus 70S, 50S und 30S Ribosomen untersucht, während für die übrigen Spezies nur 70S Proteine analysiert wurden.

Die Betrachtung der Proteinmuster nach der elektrophoretischen Auftrennung zeigt sehr große Ähnlichkeiten (Abb. 2 und 3). Obgleich die ribosomalen Proteine der Enterobacteriaceen teilweise unterschiedlich wandern, war bei den einzelnen Proteinen meist auf Grund der geringen Verschiebung eine Zuordnung zu den ribosomalen Proteinen von E.coli an Hand der zweidimensionalen Gelelektrophorese möglich. Proteine, die in den untersuchten Enterobacteriaceen anders wandern als die ribosomalen Proteine von E.coli, sind in Tabelle 2 und 3 aufgeführt.

Tabelle 2: Vergleich der ribosomalen Proteine der 30S Untereinheit zwischen E.coli K und sieben anderen Enterobacteriaceen.

Escherichia coli	Escherichia freundii	Aerobacter aerogenes	Shigella dispar	Salmonella typhimurium	Erwinia carotovora	Serratia marcescens	Proteus vulgaris
S2	+					+	+
S3							
S4							
S5	+				+	+	+
S6	+		+	+			§
S7	+=B	+=B	+=B	+=B	+=B	+=B	+=B
S8	+					+	+
S9							+
S10	+	+		+	+	+	+
S11							
S12				§			+
S13					+	+	+
S14							
S15					+	+	+
S16	+	+		+	+	+	+
S17	+				+	+	+
S18							+
S19							
S20		+		+		+	
S21							

+ bedeutet, daß das Protein in der zweidimensionalen Gelelektrophorese anders wandert als das entsprechende E.coli Protein.
§ bedeutet, daß das Protein auf dem Elektropherogramm nicht sichtbar ist.
B bedeutet, daß das Protein S7 an die gleiche Stelle wandert wie S7 von E.coli B.

Tabelle 3: Vergleich der 50S ribosomalen Proteine zwischen E.coli K und sieben anderen Enterobacteriaceen.

Escherichia coli	Escherichia freundii	Aerobacter aerogenes	Shigella dispar	Salmonella typhimurium	Erwinia carotovora	Serratia marcescens	Proteus vulgaris
L1							+
L2							
L3						+	
L4				+	+	+	
L5		+		+	+		+
L6						+	+
L7/L12					+	+	+
L8/L9							+
L10				+			
L11						+	
L13		+					
L14							
L15						+	+
L16		+		§	+	+	
L17					+	+	+
L18					+	+	
L19				+	+	+	+
L20		§		§			
L21					+		+
L22	+	+					+
L23						+	
L24							
L25	+	+		+			+
L27	+	+		+		+	+
L28							
L29		+			+		
L30		+					+
L32					+		
L33	+					+	+

Siehe Erläuterungen zu Tabelle 2.

Anzahl der ribosomalen Proteine

Die Anzahl der ribosomalen Proteine ist bei den untersuchten Enterobacteriaceen ungefähr gleich wie bei E.coli. Im Elektropherogramm von Salmonella typhimurium, Aerobacter aerogenes, Escherichia freundii, Erwinia carotovora und Serratia marcescens trat jedoch in mehreren Aufarbeitungen ein zusätzlicher Proteinfleck auf. Es handelt sich dabei um ein Protein der 50S Untereinheit, das in allen Enterobacteriaceen ungefähr an der gleichen Stelle auftritt, nämlich unterhalb von L25 (Abb. 3). Bei dem zusätzlichen Protein könnte es sich um ein Überstandsenzym handeln, das unter den angewandten Extraktionsbedingungen an das Ribosom gebunden bleibt. Ein derartiger Fall trat auch bei der Isolierung der ribosomalen Proteine von E.coli auf: der Initiationsfaktor IF_3 wurde durch Waschen mit 0,5 M NH_4Cl nicht vollständig abgewaschen und wanderte in der zweidimensionalen Gelelektrophorese in der Nähe von S5 (Wittmann und Stöffler 1972).

Eine Anzahl von Proteinen war in mehreren Läufen bei einigen Bakterien nicht sichtbar (Tabelle 2 und 3). Auf Grund der zweidimensionalen Gelelektrophorese allein kann nicht entschieden werden, ob solche Proteine in den untersuchten Enterobacteriaceen tatsächlich fehlen. Manche Proteine sind auch auf dem Elektropherogramm von E.coli nur schwach sichtbar (Kaltschmidt und Wittmann 1972). Z.B. könnten die Proteine L16 und L20, die bei E.coli an die 23S RNA binden (Stöffler et al. 1971b), bei manchen Enterobacteriaceen stärker an die RNA gebunden sein, so daß sie bei der Essigsäureextraktion nicht von der RNA dissoziieren und daher auf dem Elektropherogramm nicht sichtbar werden. Für alle "fehlenden" Proteine konnte entweder mit quantitativen oder qualitativen immunologischen Methoden kreuzreagierendes Material nachgewiesen werden (s. Immunologische Untersuchungen).

Molekulargewichte der ribosomalen Proteine.

Molekulargewichtsunterschiede lassen sich mittels Standard zweidimensionaler Gelelektrophorese nur in begrenztem Umfang feststellen. Wenn ein Protein in der Standard zweidimensionalen Gelelektrophorese in der zweiten Dimension anders wandert als in

E.coli, muß dies nicht auf einen Molekulargewichtsunterschied hindeuten. So beruht z.B. der Wanderungsunterschied von L7 und L12 in der zweiten Dimension nicht auf einem Molekulargewichtsunterschied, sondern ist auf die Acetylierung des N-terminalen Serins bei L7 zurückzuführen (Terhorst et al. 1972). Auf der anderen Seite beruht die unterschiedliche Wanderung des ribosomalen Proteins S7 aus E.coli K und E.coli B tatsächlich auf einem Unterschied im Molekulargewicht (Kaltschmidt et al. 1970a). Bei den ribosomalen Proteinen der untersuchten Enterobacteriaceen traten keine großen Wanderungsunterschiede in der zweiten Dimension der Standard zweidimensionalen Gelelektrophorese auf.

Eine genauere Bestimmung des Molekulargewichts ist möglich, wenn die 2. Dimension der zweidimensionalen Gelelektrophorese in Gegenwart von SDS durchgeführt wird. Deshalb wurden die ribosomalen Proteine von E.coli in der SDS zweidimensionalen Gelelektrophorese aufgelöst (Abb. 4). Da die erste Dimension der SDS zweidimensionalen Gelelektrophorese unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wird wie in der Standard zweidimensionalen Gelelektrophorese, war eine Zuordnung der ribosomalen Einzelproteine in den beiden elektrophoretischen Systemen möglich (Abb. 2 und 4).

Um die Molekulargewichte der einzelnen ribosomalen Proteine auf SDS Elektropherogrammen zu bestimmen, wurden die Wanderungsgeschwindigkeiten der Proteinflecken gegen das Molekulargewicht der ribosomalen E.coli Einzelproteine aufgetragen (Abb 1; s. Material und Methoden). Diese Standardkurve wurde zum Vergleich der Molekulargewichte der ribosomalen Proteine von Serratia marcescens und Proteus vulgaris mit denen von E.coli benutzt (Abb. 5). Auf Grund dieses Vergleichs ergaben sich sehr ähnliche Werte für die Molekulargewichte der ribosomalen Proteine aller drei Spezies (Abb. 4 und 5). Die Ergebnisse aus der SDS zweidimensionalen Gelelektrophorese stimmen mit dem Vergleich der Molekulargewichte an Hand der Standard zweidimensionalen Gelelektrophorese überein; d.h. die Molekulargewichte der ribosomalen Proteine liegen bei allen untersuchten Enterobacteriaceen etwa im gleichen Bereich

wie bei E.coli.

Proteine von besonderem Interesse

a) Protein S5 und S7. Die E.coli Stämme K und B unterscheiden sich in dem ribosomalen Protein S7 (Leboy et al. 1964; Otaka et al. 1968; Birge et al. 1969; Sypherd 1969; Kaltschmidt et al. 1970a). Protein S7B ist um etwa 3500 Dalton kleiner als Protein S7K (Kaltschmidt et al. 1970a), was sich in einer deutlich schnelleren Wanderungsgeschwindigkeit von S7B in der zweiten Dimension der zweidimensionalen Gelelektrophorese äußert. Sowohl Standard- als auch SDS zweidimensionale Gelelektrophorese zeigen, daß alle untersuchten Enterobacteriaceen ein B-ähnliches Protein S7 besitzen (Abb. 3 und 5). Das Protein S7 ist in der K-Form bisher nur bei E.coli K oder von diesem abgeleiteten Stämmen gefunden worden; in Bezug auf das Protein S7 sind alle untersuchten Enterobacteriaceen dem E.coli B näher verwandt als dem E.coli K.

E.coli K und E.coli B unterscheiden sich außerdem in dem ribosomalen Protein S5 (Otaka et al. 1968; Kaltschmidt et al. 1970a). S5 wandert in den untersuchten Enterobacteriaceen sehr unterschiedlich; ob bei den untersuchten Spezies das Protein S5 sich von S5K oder S5B ableitet, müßte proteinchemisch gezeigt werden, inwieweit die elektrophoretische Wanderung in der Nähe von S5K oder S5B auf dem Aminosäureaustausch Glu $\rightarrow$ Ala in dem Peptid T_1 beruht (Wittmann-Liebold und Wittmann 1971).

b). Die Proteine L7 und L12. An der Position von L7/L12 sind in allen untersuchten Enterobacteriaceen Doppelpunkte auf der zweidimensionalen Gelelektrophorese sichtbar. In E.coli haben diese beiden Proteine L7 und L12 identische Aminosäuresequenzen, der einzige Unterschied besteht in der N-terminalen Acetylierung des L7 (Terhorst et al. 1972).Der Wanderungsunterschied in der zweidimensionalen Gelelektrophorese beruht also nicht auf einem Molekulargewichtsunterschied, sondern auf den unterschiedlichen pK-Werten. Aus dem konstanten Auftreten dieser Doppelpunkte in allen untersuchten Spezies muß man schließen, daß alle Enterobacteriaceen zu E.coli L7/L12 homologe Proteine besitzen, die sich durch eine

Acetylierung oder eine andere Modifikation am N-Terminus unterscheiden.

2. Immunologische Untersuchungen.
Zusätzlich zum elektrophoretischen Vergleich wurden immunologische Untersuchungen an den ribosomalen Proteinen der Enterobacteriaceen durchgeführt. Für diese Versuche wurden Antiseren gegen ribosomale Einzelproteine (AEPS) sowie gegen 70S Ribosomen von E.coli benutzt (Anti E.coli 70S).

Tabelle 4: Allgemeine Kreuzreaktion von Anti E.coli 70S Serum gegen einige Enterobacteriaceen.

Bakterianspezies	% Kreuzreaktion
Aerobacter aerogenes	98
Erwinia carotovora	85
Proteus vulgaris	80
Serratia marcescens	82

70S Ribosomen oder gesamtribosomales Protein wurde für die Präzipitationsteste eingesetzt.

Immunpräzipitationsteste mit Anti E.coli 70S Serum. Die gesamtribosomalen Proteine von Serratia marcescens gaben mit Anti E.coli 70S Serum 82% Kreuzreaktion (Tabelle 4). Dieser Wert stimmt gut mit den Präzipitationstesten überein, die mit AEPS durchgeführt wurden (siehe unten). Entsprechende Präzipitationsteste mit Anti E.coli 70S Serum und den ribosomalen Proteinen anderer Enterobacteriaceen ergaben zwischen 80% (Proteus vulgaris) und 98% (Aerobacter aerogenes) Kreuzreaktion (Tabelle 4). Dieses Ergebnis ist besonders für Aerobacter aerogenes interessant, da man auf Grund der zweidimensionalen Gelelektrophorese eine so starke Kreuzpräzipitation zwischen Aerobacter aerogenes und E.coli nicht erwartet hätte (vergleiche Abb. 3 und Tabelle 2 und 3).

Immunpräzipitationsteste mit Anti E.coli Einzelproteinseren (AEPS). Quantitative Immunpräzipitationsteste mit AEPS wurden nur für Serratia marcescens durchgeführt (Tabelle 5, Spalte 3 und 4). Fast alle untersuchten AEPS zeigten mit Serratia marcescens eine deutlich geringere Kreuzreaktion als mit den ribosomalen Proteinen von E.coli (Tabelle 5). Ribosomale Proteine, die auf dem zweidimensionalen Elektropherogramm von Serratia marcescens die gleiche Wanderung zeigten wie die ribosomalen E.coli Proteine, sind mit den E.coli Proteinen also nicht identisch.

Der Mittelwert sämtlicher Präzipitationsteste von Serratia marcescens mit AEPS lag bei 81%, mit dem niedrigsten Wert bei 49% (S16) und dem höchsten Wert bei 145% (S21). Die Tatsache, daß Anti E.coli S21 mit den gesamtribosomalen Proteinen von Serratia marcescens eine höhere Kreuzpräzipitation gab als mit E.coli Proteinen, mag darauf zurückzuführen sein, daß S21 als "fractional" Protein (Voynow und Kurland 1971; Weber 1972) in Serratia marcescens in einer höheren Konzentration am Ribosom vorkommt als bei E.coli. So zeigen "fractional" Proteine bei Serratia marcescens im Mittel eine signifikant höhere Kreuzpräzipitation als die übrigen Proteine (91% Kreuzpräzipitation für "fractional" Proteine gegenüber 78% für die übrigen Proteine).

Da die Höhe des Präzipitats nicht nur vom Grad der Ähnlichkeit, sondern auch von der Konzentration des entsprechenden Proteins am Gesamtribosom abhängt, kann man zumindest für die fractional Proteine von Serratia marcescens keine Schlüsse über Ähnlichkeiten oder Unähnlichkeiten zu den ribosomalen E.coli Proteinen ziehen. Aus diesem Grunde wurden mit den gleichen AEPS Doppeldiffusionsteste durchgeführt, da es bei Doppeldiffusionstesten möglich ist, unabhängig von der Stoichiometrie teilweise oder vollständige Kreuzreaktion festzustellen.

Doppeldiffusionsteste mit E.coli Anti Einzelproteinseren (AEPS). Doppeldiffusionsteste mit ribosomalen Proteinen von Serratia marcescens ergaben nur für Anti S2, -S5, -S13 (Abb. 6) und -S14 deutliche Spurbildungen; d.h. bei diesen Proteinen wurde ein Unter-

Tabelle 5: Auswertung quantitativer Immunpräzipitationsteste von Anti E.coli Einzelproteinseren gegen gesamtribosomales Protein von E.coli und Serratia marcescens.

	E.coli	Serratia marcescens	
AEPS	mg	mg	%
S1	0.442	0.422	96
S2	0.287	0.230	80
S3	0.185	0.202	109
S4	0.212	0.177	84
S5	0.247	0.197	80
S6	0.107	0.071	66
S7	0.141	0.108	77
S8	0.477	0.407	85
S9	0.382	0.302	79
S10	0.367	0.307	84
S11	0.302	0.257	85
S12	0.073	0.046	63
S13	0.452	0.332	74
S14	0.397	0.367	92
S15	0.227	0.177	78
S16	0.157	0.077	49
S18	0.237	0.222	94
S19	0.557	0.417	75
S20	0.192	0.107	56
S21	0.105	0.152	145
L1	0.287	0.192	67
L3	0.157	0.140	89
L5	0.377	0.272	72
L7	0.817	0.612	75
L12	0.457	0.362	79
L14	0.177	0.180	100
L17	0.407	0.297	73
L20	0.242	0.177	73
L24	0.717	0.607	85

In der Tabelle sind die erhaltenen Proteinwerte aus den Folinreaktionen in mg angegeben, außerdem wurde für Serratia marcescens die prozentuale Kreuzreaktion im Vergleich zu der homologen Reaktion angegeben.

schied in den antigenen Determinanten gegenüber den ribosomalen E.coli Proteinen gefunden. Die übrigen AEPS ergaben keine Spurbildungen mit den ribosomalen Proteinen von Serratia marcescens, d.h. keine Unterschiede in den antigenen Determinanten konnten festgestellt werden. Würden die Doppeldiffusionsteste mit isolierten Einzelproteinen von Serratia marcescens durchgeführt, sollte man jedoch für sehr viel mehr Proteine eine partielle Kreuzreaktion (d.h. Spurbildung) erwarten.

Alle E.coli AEPS zeigten mit den ribosomalen Proteinen aller untersuchten Enterobacteriaceen eine Kreuzreaktion, auch mit den Proteinen, die auf dem Elektropherogramm nur schwach oder gar nicht sichtbar waren (Abb. 7).

B. Pseudomonadaceen und Spirillaceen.

Manche Gattungen aus der Familie der Pseudomonadaceen und die Gattung Vibrio aus der Familie der Spirillaceen weisen physiologisch zahlreiche Übereinstimmungen mit den Enterobacteriaceen auf (Ferguson und Henderson 1947; Stanier et al. 1970). Aus diesem Grunde wurden die ribosomalen Proteine von Aeromonas punctata, Plesiomonas shigelloides und Vibrio cuneatus mit den ribosomalen Proteinen von E.coli verglichen.

1. Zweidimensionale Gelelektrophorese.
Die 70S ribosomalen Proteine von Plesiomonas shigelloides (Abb. 8), Aeromonas punctata (Abb. 9) und Vibrio cuneatus (Abb. 10) wurden in der Standard zweidimensionalen Gelelektrophorese aufgetrennt und mit dem Elektropherogramm von E.coli verglichen (Abb. 2). Die Anzahl der ribosomalen Proteine war in allen drei Spezies etwa die gleiche wie bei E.coli.

Das Proteinmuster von Plesiomonas shigelloides wies große Ähnlichkeiten mit dem Elektropherogramm von E.coli auf (Abb. 8). Obgleich etwa 4/5 der ribosomalen Proteine elektrophoretisch anders wanderten als in E.coli (Tabelle 6), konnten noch fast alle Proteine denen von E.coli zugeordnet werden.

Protein S7 wanderte wie bei allen untersuchten Enterobacteriaceen auch bei Plesiomonas shigelloides an die Stelle von S7B. Auch an der Position von L7/L12 ist bei Plesiomonas shigelloides ein Doppelspot sichtbar, woraus man schließen muß, daß die zu E.coli L7/L12 homologen Proteine auch in Plesiomonas shigelloides eine Acetylierung oder andere Modifikation am N-Terminus besitzen. Vergleicht man das Proteinmuster von Plesiomonas shigelloides mit dem Elektropherogramm der nahe verwandten Art Aeromonas punctata, so zeigt Plesiomonas shigelloides in seinen ribosomalen Proteinen eine größere Verwandtschaft zu E.coli als zu Aeromonas punctata.

Bei Aeromonas punctata konnte an Hand der Standard zweidimensionalen Gelelektrophorese nur etwa 1/4 der ribosomalen Proteine denen von E.coli überhaupt zugeordnet werden (Abb. 9). Diese Zu-

Tabelle 6: Vergleich der ribosomalen Proteine von E.coli K und Plesiomonas shigelloides.

E.coli	Plesiomonas	E.coli	Plesiomonas
S2	+	L5	+
S3		L6	
S4		L7/L12	+
S5	+	L8/L9	
S6	+	L10	+
S7	+=B	L11	
S8	+	L13	
S9	+	L14	+
S10	+	L15	+
S11	§	L16	+
S12	§	L17	
S13	+	L18	+
S14	§	L19	+
S15	+	L20	+
S16	+	L21	+
S17	+	L22	+
S18	+	L23	+
S19	+	L24	+
S20		L25	+
S21	+	L27	+
		L28	+
L1		L29	+
L2	+	L30	
L3	+	L32	
L4	+	L33	+

Erläuterungen siehe Tabelle 2.

ordnung zu den ribosomalen Proteinen von E.coli, wie sie in Abb. 9 dargestellt ist, beruht auf der elektrophoretischen Wanderung, der Intensität und der relativen Lage der Proteine zueinander; sie dient als Mittel, Ähnlichkeiten zwischen den ribosomalen Proteinen von Aeromonas punctata und E.coli beschreibend zu erfassen. Eine Homologie der zugeordneten Proteine kann auf Grund der zweidimensionalen Gelelektrophorese allein nicht gezeigt werden, ist jedoch für gleich oder ähnlich wandernde Punkte sehr wahrscheinlich. Zum Beweis, daß di zugeordneten Proteine tatsächlich homolog sind, müßten weitere immunologische oder proteinchemische Untersuchungen durchgeführt werden. Im zweiten Teil dieser Arbeit wird gezeigt, wie mittels immunologischer, proteinchemischer und funktioneller Untersuchungen den E.coli Proteinen L2 und L7/L12 in verschiedenen Bakterienspezies die homologen Proteine zugeordnet werden konnten.

Die ribosomalen Proteine von Vibrio cuneatus (Abb. 10) wiesen in der Standard zweidimensionalen Gelelektrophorese keinerlei Ähnlichkeiten mit den ribosomalen Proteinen der übrigen Bakterienspezies auf. Eine Zuordnung der ribosomalen Proteine von Vibrio cuneatus zu denen von E.coli war mit Sicherheit nur für das Protein L2 möglich (Abb. 10).

2. Immunologische Untersuchungen

Für Plesiomonas shigelloides und Aeromonas punctata wurden analog zu den Präzipitationstesten mit Serratia marcescens (Tabelle 5) quantitative Immunpräzipitationsteste mit Anti E.coli Einzelproteinseren (AEPS) durchgeführt (Tabelle 7).

Plesiomonas shigelloides zeigte in allen Fällen eine deutliche Kreuzreaktion mit den AEPS von E.coli; der Mittelwert der Kreuzpräzipitation lag bei 62%, mit dem höchsten Wert bei 125% (S21) und dem niedrigsten Wert bei 35% (L12). Diese Ergebnisse unterstützen die Befunde der zweidimensionalen Gelelektrophorese und ordnen der Spezies Plesiomonas shigelloides einen Platz in der Nähe von E.coli zu.

Bei Aeromonas punctata lag die Kreuzpräzipitation im Mittel bei 32%.

Tabelle 7: Auswertung quantitativer Immunpräzipitationsteste von Anti E.coli Einzelproteinseren gegen gesamtribosomales Protein von Plesiomonas shigelloides und Aeromonas punctata.

	Plesiomonas shigelloides		Aeromonas punctata	
AEPS	mg	%	mg	%
S1	0.327	74	0.145	33
S2	0.200	70	0.042	15
S3	0.147	80	0.046	25
S4	0.165	78	0.047	22
S5	0.175	71	0.004	2
S6	0.040	37	0.022	21
S7	0.105	76	0.004	3
S8	0.292	61	0.095	20
S9	0.227	59	0.132	35
S10	0.242	66	0.062	17
S11	0.172	57	0.092	31
S12	0.054	74	0.028	38
S13	0.337	75	0.162	36
S14	0.227	57	0.147	37
S15	0.152	67	0.058	26
S16	0.087	55	0.082	52
S18	0.167	71	0.072	31
S19	0.337	61	0.207	37
S20	0.107	56	0.042	22
S21	0.132	126	0.017	16
L1	0.167	58	0.050	17
L3	0.097	62	0.000	0
L5	0.257	68	0.145	39
L7	0.407	50	0.347	43
L12	0.162	35	0.207	45
L14	0.150	85	0.027	15
L17	0.302	74	0.222	55
L20	0.127	53	0.072	30
L24	0.487	68	0.397	55

In der Tabelle sind die erhaltenen Proteinwerte aus den Folinreaktionen in mg angegeben, außerdem wurde die prozentuale Kreuzreaktion im Vergleich zu der homologen Reaktion (Tabelle 5) angegeben.

In einem Fall zeigte Aeromonas punctata gar keine (L3) und in zwei Fällen eine nahe Null liegende Kreuzpräzipitation (S5 und S7). Mehr als 50% Kreuzpräzipitation trat bei S16, L17 und L24 auf. Da unter den gleichen Versuchsbedingungen die ribosomalen Proteine von Bacillus subtilis (Ergebnisse nicht aufgeführt) mit den E.coli AEPS gar nicht kreuzpräzipitierten, scheint die relativ geringe Kreuzreaktion der ribosomalen Proteine von Aeromonas punctata doch auf nähere Verwandtschaftsbeziehungen zwischen E.coli und Aeromonas punctata hinzuweisen.

Im Vergleich mit den Präzipitationstesten mit Serratia marcescens (Tabelle 5) fällt auf, daß Plesiomonas shigelloides für S21 ebenfalls eine signifikant über 100% liegende Kreuzpräzipitation aufweist. Die gleichen Überlegungen wie für Serratia marcescens lassen auch hier eine höhere Konzentration von S21 bei Plesiomonas shigelloides vermuten. Auffällig ist in diesem Zusammenhang, daß bei Aeromonas punctata die Kreuzpräzipitation für S21 niedriger liegt als im Mittel (16% gegenüber einem Mittel von 32%).

Die Immunpräzipitationsteste der E.coli AEPS mit den ribosomalen Proteinen verschiedener Bakterienspezies (Tabelle 5 und Tabelle 7) sollten zur Beantwortung der Frage beitragen, ob einzelne Proteine oder Proteingruppen während der Evolution bevorzugt konserviert wurden. Kein AEPS zeigte mit den ribosomalen Proteinen aller untersuchten Bakterienspezies eine auffallend hohe oder niedrige Kreuzpräzipitation, so daß aus den vorliegenden Versuchen keine Schlüsse über eine unterschiedliche Konservierung der Proteine während der Evolution gezogen werden können.

C. Bacillaceen.

Die Bacillaceen bilden morphologisch eine ziemlich homogene Gruppe, da die Fähigkeit, mehr oder weniger thermoresistente Sporen zu bilden, mit wenigen Ausnahmen auf die Familie der Bacillaceen beschränkt ist. Die aeroben und fakultativ anaeroben Bacillaceen sind in der Gattung Bacillus, die anaeroben in der Gattung Clostridium zusammengefaßt.

1. Zweidimensionale Gelelektrophorese.
Die ribosomalen Proteine aller in Tabelle 1 aufgeführten Bacillaceen wurden mittels Standard- und SDS zweidimensionaler Gelelektrophorese aufgetrennt (Abb. 11-17). Die eigenen Befunde zeigen, daß die ribosomalen Proteine der verschiedenen Bacillaceen sich von E.coli, aber auch untereinander, meist ganz wesentlich in ihrer elektrophoretischen Wanderung unterscheiden. Aus diesem Grunde war ein Vergleich der ribosomalen Proteinmuster der Bacillaceen mit dem von E.coli nicht möglich, sondern B.subtilis wurde als typischer Vertreter der Bacillaceen als Referenzsystem ausgewählt.

B.subtilis.
Die ribosomalen Proteine der 30S, 50S und 70S Partikel von B.subtilis wurden in Standard zweidimensionaler Gelelektrophorese aufgetrennt und mit BS1 - BS21 bzw. BL1 - BL30 durchnummeriert, entsprechend der Methode, die Kaltschmidt und Wittmann (1970b) für E.coli anwandten (Abb. 11 und 12). Diese Nomenklatur ist völlig unabhängig von der E.coli Nomenklatur (Kaltschmidt und Wittmann 1970b; das Protein mit der Bezeichnung BS9, z.B., ist keinesfalls mit dem E.coli Protein S9 homolog. Nur in zwei Fällen (siehe Abbildung 11 und 12 sowie Teil II) war eine strukturelle und funktionelle Zuordnung der ribosomalen Proteine von B.subtilis zu denen von E.coli möglich.

Die erste Dimension von Standard- und SDS zweidimensionaler Gelelektrophorese wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt, so daß eine Zuordnung der ribosomalen Einzelproteine in den beiden elektrophoretischen Systemen in den meisten Fällen möglich war

(Abb. 13). Die Zuordnung erfolgte an Hand der 30S und 50S Untereinheiten, da eine Zuordnung auf Grund der 70S ribosomalen Proteine nur sehr viel schwerer möglich ist. Einige Proteine (z.B. BL28 - BL30) konnten auf Grund der zweidimensionalen Gelelektrophoresen allein nicht zugeordnet werden, Untersuchungen mit reinen Einzelproteinen könnten diese Fragen der Zuordnung klären.

Die Proteine S9, S10 und L25 erscheinen in der Standard zweidimensionalen Gelelektrophorese als Doppelpunkte, während sie in der SDS zweidimensionalen Gelelektrophorese als je ein Punkt auftreten. Andere Proteine (S1, S20) wandern identisch in der Standard zweidimensionalen Gelelektrophorese, in der SDS zweidimensionalen Gelelektrophorese dagegen weisen sie eine unterschiedliche Wanderung in der 2. Dimension auf (Abb. 11 - 13). Beide Ergebnisse sollten Anlaß zu weiterführenden Experimenten geben, um zu klären, ob es sich in den erwähnten Fällen um ein identisches Protein oder um zwei verschiedene Proteine handelt.

Vergleich der Standard zweidimensionalen Elektropherogramme verschiedener Bacillen.
Die Anzahl der ribosomalen Proteine und ihre generelle Verteilung auf dem Elektropherogramm war bei allen untersuchten Bacillen ähnlich wie bei B.subtilis. Nur im Elektropherogramm von B.stearothermophilus traten mehr Proteinflecken auf als bei B.subtilis. Dieses Ergebnis stimmt gut mit Befunden von Horne und Erdmann (1972) überein, die 38 Proteine in der 50S Untereinheit von B.stearothermophilus fanden.

Das ribosomale Proteinmuster von B.licheniformis (Abb. 14a) weist die größten Ähnlichkeiten mit B.subtilis (Abb. 11) auf. Zahlreiche ribosomale Proteine von B.megaterium und B.pumilis (Abb. 14b) besitzen ebenfalls die gleiche elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit wie die ribosomalen Proteine von B.subtilis. In den Standard zweidimensionalen Elektropherogrammen von B.circulans (Abb. 14c), B.brevis, B.coagulans (Abb. 14d) und B.stearothermophilus dagegen können nur jeweils 10 bis 20 Proteine denen von B. subtilis mit einiger Sicherheit zugeordnet werden. Diese elektro-

Tabelle 8: Anzahl der ribosomalen Proteine, die denen von B.subtilis zugeordnet werden kann.

	70S	30S	50S
B.licheniformis	42	17	25
B.pumilis	30	14	16
B.megaterium	27	10	17
B.circulans	22	10	12
B.brevis	14	7	7
B.coagulans	12	6	6
B.stearothermophilus	11	5	6

Für jede Bakterienspezies ist die Anzahl der ribosomalen Proteine, die an Hand der zweidimensionalen Gelelektrophorese denen von B.subtilis zugeordnet werden konnte, aufgeführt. Die zugeordneten Proteine sind getrennt für 70S, 50S und 30S Partikel aufgeführt. Die Anzahl der ribosomalen Proteine beträgt in B.subtilis 21 für die 30S Untereinheit und 30 für die 50S Untereinheit.

---

phoretische Zuordnung der ribosomalen Proteine beruht auf den gleichen Kriterien, wie sie bei dem Vergleich der ribosomalen Proteine von Aeromonas punctata mit denen von E.coli angewandt wurden (s. I,B); eine Homologie der zugeordneten Proteine kann auch hier auf Grund der zweidimensionalen Gelelektrophorese allein nicht gezeigt werden, ist jedoch sehr wahrscheinlich.

Die elektrophoretische Zuordnung der ribosomalen Proteine BS12, BS14, BS20, BS18, BL1, BL2 und BL4 konnte in allen untersuchten Bacillen erfolgen. Da diese Proteine jedoch in den zweidimensionalen Elektropherogrammen an besonders exponierten Stellen auf-

treten, ist ihre Erfassung und Zuordnung besonders leicht möglich. In Tabelle 8 ist die Anzahl der ribosomalen Proteine, die an Hand der Standard zweidimensionalen Gelelektrophorese denen von B.subtilis zugeordnet werden konnte, nochmals für jede Bakterienspezies aufgeführt.

Vergleich der Standard zweidimensionalen Elektropherogramme verschiedener Clostridien.
Die ribosomalen Proteine verschiedener Clostridium Spezies als auch verschiedner Typen von Clostridium perfringens wurden mit Essigsäure extrahiert und in der Standard zweidimensionalen Gelelektrophorese aufgetrennt (Abb. 15, 16). Da die ribosomalen Proteinmuster der Clostridien fast gar keine Ähnlichkeiten mit dem Elektropherogramm von B.subtilis zeigten (Abb. 11, 12), wurde auf eine Zuordnung zu den ribosomalen Proteinen von B.subtilis verzichtet.

Die ribosomalen Proteine aller untersuchten Typen von Clostridium perfringens zeigten fast identische Wanderung in der zweidimensionalen Gelelektrophorese (Abb. 15). Die meisten Typen können an Hand der zweidimensionalen Gelelektrophorese nicht eindeutig voneinander unterschieden werden (Abb. 15).

Die ribosomalen Proteine von Clostridium sporogenes, Clostridium septicum und Clostridium pasteurianum wanderten in der zweidimensionalen Gelelektrophorese zwar ganz anders als bei den verschiedenen Typen von Clostridium perfringens (Abb. 16), wiesen jedoch untereinander ebenfalls nur geringe Unterschiede auf: Lediglich die ribosomalen Proteine von Clostridium pasteurianum unterschieden sich in drei Fällen geringfügig von den ribosomalen Proteinen der beiden anderen Spezies (Abb. 16).

Clostridium butyricum unterschied sich in seinem ribosomalen Proteinmuster erheblich von allen anderen untersuchten Clostridien. Diese Ergebnisse zeigen, daß der Genus Clostridium ähnlich wie der Genus Bacillus eine Reihe unterschiedlicher Spezies aufweist, andererseits jedoch einzelne Spezies so nahe miteinander verwandt sind, daß ihre Unterscheidung auf Grund der zweidimensionalen Gel-

elektrophorese nicht immer möglich ist.

Vergleich der Molekulargewichte der ribosomalen Proteine verschiedener Bacillaceen.
Die Molekulargewichte der ribosomalen Proteine der verschiedenen Bacillaceen konnten an Hand der SDS zweidimensionalen Gelelektrophoresen bestimmt werden. Sie reichen von ca. 9000 bis 33.000 (Abb. 13 und 17). Das Molekulargewicht von etwa 2/3 der ribosomalen Proteine liegt in dem Bereich von 12.000 bis 20.000. Damit zeigen die ribosomalen Proteine der Bacillaceen in ihrem Molekulargewicht große Übereinstimmungen mit den ribosomalen Proteinen von E.coli.

Eine Zuordnung der einzelnen ribosomalen Proteine der verschiedenen Bacillaceen ist an Hand der SDS zweidimensionalen Elektropherogramme weitaus schwieriger als auf Grund der Standard zweidimensionalen Gelelektrophorese, da die ribosomalen Proteine in der SDS zweidimensionalen Gelelektrophorese auf Grund der ähnlichen Molekulargewichte stärker überlappen (Abb. 13). Das SDS Elektropherogramm von B.subtilis zeigt nur wenige Übereinstimmungen mit den Elektropherogrammen der übrigen Bacillen. Die ribosomalen Proteine von B.circulans, B.cereus und B.coagulans, die auf Standard Elektropherogrammen keine großen Ähnlichkeiten zeigten, wiesen auf SDS Elektropherogrammen dagegen größere Übereinstimmungen auf (Abb. 17).

2. Immunologische Untersuchungen.

Antiseren gegen einzelne ribosomale Proteine von E.coli.
Während die Elektropherogramme der Bacillaceen mit dem von E.coli kaum Ähnlichkeiten aufwiesen, war zu erwarten, daß sich mit Hilfe von immunologischen Methoden größere Übereinstimmungen finden lassen. Aus diesem Grunde wurden die ribosomalen Proteine verschiedener Bacillaceen in Doppeldiffusionstesten (Ouchterlony) auf ihre Kreuzreaktion mit E.coli AEPS untersucht (Tabelle 9 und 10).

30S Untereinheit. Antiseren gegen die ribosomalen Einzelproteine der 30S Untereinheit von E.coli kreuzreagierten am besten mit B.coagulans und B.cereus (18 kreuzreagierende Proteine), während

mit den ribosomalen Proteinen von B.subtilis nur 10 Antiseren kreuzreagierten (Tabelle 9).

Die Intensität der Kreuzreaktion mit einem bestimmten Antiserum von E.coli schwankte sehr stark innerhalb der Bacillen; mit S16 z.B. zeigte B.licheniformis eine sehr starke Kreuzreaktion (+++), während B.subtilis mit S16 überhaupt nicht kreuzreagierte. B. licheniformis zeigte eine relativ starke Kreuzreaktion bei fast allen reagierenden Proteinen (++ bis +++). Die Intensität der Kreuzreaktion bei B.coagulans war fast so stark wie bei B.licheniformis, während B.cereus eine ziemlich schwache Kreuzreaktion zeigte.

Alle untersuchten Bacillen reagierten mit Anti E.coli S1, S2, S3, S7, S10, S11, S13, S14 und S19, von denen S11 und S19 in allen Bacillen fast gleich stark reagierten. Keines der untersuchten Bacillen reagierte mit Anti E.coli S20 und S21.

50S Untereinheit. Antiseren gegen die ribosomalen Einzelproteine der 50S Untereinheit von E.coli kreuzreagierten am besten mit B.stearothermophilus (16 kreuzreagierende Proteine), während mit B.circulans nur 11 der Antiseren reagierten (Tabelle 10).

Die Intensität der Kreuzreaktion mit einem bestimmten Antiserum von E.coli schwankte in dem gleichen Maße wie bei den Antiseren gegen Proteine der 30S Untereinheit. Alle untersuchten Bacillen reagierten mit Anti E.coli L2, L5, L10, L14, L18 und L24, während keines der untersuchten Bacillen eine Kreuzreaktion mit Anti E.coli L1, L8, L13, L16, L17, L22, L25, L31, L32, L33 und L34 zeigte. Während in der 50S Untereinheit maximal 50% der ribosomalen Proteine von E.coli eine Kreuzreaktion mit den ribosomalen Proteinen aus Bacillaceen aufwiesen, zeigten unter den gleichen Bedingungen bis zu 90% der ribosomalen E.coli Proteine der 30S Untereinheit eine Kreuzreaktion. Auf Grund dieser Ergebnisse scheint es, als seien die ribosomalen Proteine der 30S Untereinheit während der Evolution stärker konserviert worden als die der 50S Untereinheit.

Tabelle 9: Kreuzreaktion von Antiseren gegen 30S ribosomale Proteine von E.coli mit den ribosomalen Proteinen verschiedener Bacillen.

Anti E.coli	B.cer.	B.lich.	B.circ.	B.coag.	B.pum.	B.stth.	B.sub.
S1	+++	++	+	+++	+	+	(+)
S2	+++	+++	++	+++	++	++	(+)
S3	+++	+++	+++	+++	++	++	(+)
S4	(+)	(+)	-	++	(+)	-	-
S5	+++	+++	++	(+)	(+)	-	-
S6	(+)	-	(+)	(+)	-	(+)	-
S7	+	++	+	(+)	(+)	(+)	(+)
S8	+	++	(+)	(+)	(+)	+	-
S9	+	++	(+)	++	(+)	-	+
S10	+	+++	++	+++	+	++	+
S11	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++
S12	+	++	++	++	-	(+)	-
S13	+	+++	+++	+++	++	++	+
S14	++	+++	++	+++	+	(+)	++
S15	+	+++	++	+++	+	++	-
S16	+	+++	+	(+)	-	(+)	-
S18	+	(+)	(+)	+	-	(+)	-
S19	+++	+++	+++	+++	(+)	+++	+++
S20	-	-	-	-	-	-	-
S21	-	-	-	-	-	-	-

Die Kreuzreaktion wurde auf Grund ihrer Intensität in fünf Klassen unterteilt: +++ für eine starke Kreuzreaktion bis - für gar keine Kreuzreaktion

Tabelle 10: Kreuzreaktion von Antiseren gegen 50S ribosomale Proteine von E.coli mit den ribosomalen Proteinen verschiedener Bacillen.

Anti E.coli	B.stth.	B.coag.	B.lich.	B.cer.	B.pum.	B.circ.	B.sub.
L1	-	-	-	-	-	-	-
L2	++	+++	+++	++	+++	+++	++
L3	(+)	+	(+)	-	(+)	(+)	(+)
L4	-	-	-	-	-	(+)	-
L5	(+)	+++	+++	++	(+)	++	(+)
L6	(+)	(+)	-	-	(+)	-	(+)
L7/L12	++	+++	-	++	+	(+)	(+)
L8	-	-	-	-	-	-	-
L9	(+)	-	-	-	(+)	-	-
L10	+++	+++	+++	+++	(+)	+++	++
L13	-	-	-	-	-	-	-
L14	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
L15	(+)	-	-	-	-	-	-
L16	-	-	-	-	-	-	-
L17	-	-	-	-	-	-	-
L18	+	(+)	+++	++	++	(+)	+++
L19	+	-	(+)	-	-	-	-
L20	+++	+++	+	++	-	-	-
L21	-	+	++	+++	++	-	+++
L22	-	-	-	-	-	-	-
L23	(+)	(+)	-	-	-	-	-
L24	++	+++	+++	++	++	+++	++
L25	-	-	-	-	-	-	-
L27	-	(+)	(+)	-	-	-	(+)
L28	-	++	+	-	-	+	-
L29	(+)	-	(+)	-	-	-	(+)
L30	-	(+)	+++	(+)	+++	+	(+)
L31	-	-	-	-	-	-	-
L32	-	-	-	-	-	-	-
L33	-	-	-	-	-	-	-
L34	-	-	-	-	-	-	-
A	++	(+)	-	+	-	-	-

Die Symbole sind die gleichen wie in Tabelle 9. Anti E.coli L7 ergab die gleiche Kreuzreaktion wie Anti E.coli L12 auf Grund der fast identischen Sequenzen der beiden Proteine. "A" ist ein Protein der 50S Untereinheit, das von Mora et al. (1971) beschrieben wurde.

Antiseren gegen 70S Ribosomen

Analog zu den Untersuchungen an Enterobacteriaceen (Tabelle 4) wurden für verschiedene Bacillen quantitative Immunpräzipitationsteste mit Anti E.coli und Anti B.subtilis 70S Serum durchgeführt (Abb. 18). Die Teste wurden mit intakten 70S Ribosomen (8 OD_{260}/ml) durchgeführt.

Unter allen Bacillen reagierten die Ribosomen von B.stearothermophilus am stärksten mit dem E.coli Serum (30% Kreuzreaktion), während B.subtilis nur 20% und B.pumilis sogar eine noch geringere Kreuzreaktion zeigten (Abb. 18a).

In den Präzipitationstesten mit Anti B.subtilis 70S Serum zeigten B.licheniformis als auch B.stearothermophilus eine sehr hohe Kreuzreaktion (90%; Abb. 18b). Innerhalb der Bacillen sank die Kreuzreaktion bei B.coagulans und B.cereus bis auf 50% ab, während E.coli Ribosomen nur noch zu 25% kreuzreagierten. Diese immunologischen Ergebnisse spiegeln deutlich die großen Unterschiede in den ribosomalen Proteinmustern der zweidimensionalen Gelelektrophoresen wieder.

Diskussion zu I.

Das Ribosom ist ein hervorragendes Objekt zum Studium molekularer Evolution, da es drei RNAs und über fünfzig Proteine enthält, die gemeinsam eine funktionelle Einheit bilden. Der Zusammenbau (Assembly) des Ribosoms als auch zahlreiche seiner Funktionen setzen eine große Koordination der einzelnen Komponenten voraus, es ist darum wahrscheinlich, daß die Sequenzen und auch die Konformation der ribosomalen Proteine und der rRNA-Moleküle während der Evolution bewahrt wurden. Eine solche Konservierung ist nötig, um eine genaue Protein-Protein, Protein-RNA und RNA-RNA Wechselwirkung zu gewährleisten. Außerdem reagiert das Ribosom während der Proteinbiosynthese mit einer Anzahl von t-RNAs und verschiedenen Faktoren, die für die Initiation, Elongation und Termination benötigt werden. Auf Grund dieser zahlreichen Anforderungen sollte die Ribosomenstruktur stärker konserviert sein als die Struktur der meisten Enzyme.

Das Anliegen dieser Arbeit war es, zu untersuchten, ob bestimmte Proteine während der Evolution stärker konserviert wurden als andere. Auf der zweidimensionalen Gelelektrophorese zeigten sich innerhalb der Familie der Enterobacteriaceen nur wenige Unterschiede in den ribosomalen Proteinen, was auf eine hohe Konservierung der ribosomalen Proteine hindeutet. Sechs Proteine der 30S Untereinheit (S3, S4, S11, S14, S19 und S21) und vier Proteine der 50S Untereinheit (L2, L14, L24 und L28) wanderten in allen Enterobacteriaceen identisch mit den ribosomalen Proteinen von E.coli, während andere Proteine, z.B. S10, S16 und L27 in den meisten Enterobacteriaceen unterschiedlich zu E.coli wanderten (Tabelle 2 und 3). Daraus muß man schließen, daß die ribosomalen Proteine innerhalb der Enterobacteriaceen während der Evolution unterschiedlich konserviert wurden.

Während Plesiomonas shigelloides, dessen taxonomische Zuordnung innerhalb der Pseudomonadaceen umstritten ist, im Elektropherogramm noch große Ähnlichkeiten mit den ribosomalen Proteinen der Enterobacteriaceen aufwies, zeigten Aeromonas punctata, Vibrio cuneatus

und alle Bacillaceen in der zweidimensionalen Gelelektrophorese keine Übereinstimmungen mit den ribosomalen Proteinen von E.coli. Mittels immunologischer Methoden konnten jedoch für die meisten ribosomalen Proteine strukturelle Homologien mit den ribosomalen Proteinen von E.coli nachgewiesen werden.

Mit Anti E.coli 70S Serum zeigten die ribosomalen Proteine der untersuchten Bacillaceen zwischen 15% und 30% Kreuzreaktion. Diese Kreuzreaktion des Anti E.coli 70S Serums entspricht nicht einer einheitlichen Kreuzreaktion aller 55 Proteine, sie stellt vielmehr einen Mittelwert aus weitgehend unterschiedlich kreuzreagierenden Proteinen dar. Doppeldiffusionsteste mit E.coli AEPS zeigten, daß die Proteine der 30S Untereinheit in ihrer Gesamtheit stärker kreuzreagierten als die der 50S Untereinheit. Innerhalb der 30S Untereinheit wiesen S11 und S19, innerhalb der 50S Untereinheit die Proteine L2, L10, L14 und L24 eine sehr starke Kreuzreaktion auf. Vergleicht man die Ergebnisse aus dem elektrophoretischen Vergleich an Enterobacteriaceen (Tabelle 2 und 3) mit den immunologischen Untersuchungen an Bacillaceen (Tabelle 9 und 10), so stimmen die ribosomalen Proteine, die innerhalb der Enterobacteriaceen keine Veränderung auf dem Elektropherogramm zeigten, meistens mit den ribosomalen Proteinen der Bacillen überein, die in Doppeldiffusionstesten eine besonders starke Kreuzreaktion mit den E.coli AEPS ergaben. Für das Protein L2 konnte tatsächlich gezeigt werden, daß es auch innerhalb weit entfernter Bakterien stark konserviert ist (siehe Teil II). Nur drei Proteine, die auf der zweidimensionalen Gelelektrophorese der Enterobacteriaceen nicht verändert waren, wiesen mit den ribosomalen Proteinen der Bacillaceen geringe (S4, L28) bzw. gar keine (S21) Strukturhomologien auf. Diese Ergebnisse sollten Anlaß zu weiteren Untersuchungen geben, ob die aufgeführten ribosomalen Proteine auch in anderen Bakterienspezies eine besonders starke Konservierung ihrer Struktur zeigen.

Die Untersuchungen an den ribosomalen Proteinen verschiedener Bakterienspezies stellen auch eine Bereicherung für die Taxonomie dar. In den Enterobacteriaceen ist das Elektropherogramm von Shigella dispar fast identisch mit dem von E.coli. Bei E.freundii,

Aerobacter aerogenes und Salmonella typhimurium wandern 10 bis 12 Proteine anders als bei E.coli, während Erwinia carotovora, Serratia marcescens und vor allem Proteus vulgaris sehr viel mehr Wanderungsunterschiede gegenüber den ribosomalen Proteinen von E.coli aufweisen. Diese Ergebnisse stimmen nicht völlig mit der Taxonomie nach Bergey (1957) überein; ähnliche Ergebnisse wurden jedoch durch DNA-DNA (McCarthy und Bolton 1963; Brenner et al. 1969) und DNA-RNA Hybridisierungen (Denney und Yankofsky 1972) gewonnen. Außer für Proteus ist auch der GC-Gehalt innerhalb der Enterobacteriaceen sehr ähnlich. Unsere Ergebnisse stimmen auch mit denen von Osawa et al. (1971) überein, der die ribosomalen Proteine des Genus Escherich und nahe verwandter Bakterien durch Säulenchromatographie untersuchte. Diese Autoren fanden zwischen E.coli und Shigella dysenteria nur zwei Unterschiede in den Proteingipfeln, während zwischen E.coli und verschiedenen E.freundii Stämmen bis zu 12 Unterschiede auftraten. Auch stimmen die Ergebnisse über den Vergleich der ribosomalen Proteine gut mit Rekombinationsversuchen überein: Rekombination ist nicht möglich zweischen E.coli und E.freundii, sie ist jedoch sehr gut möglich zwischen E.coli und Shigella Stämmen (Luria und Burrous 1957).

Die Spezies Plesiomonas shigelloides wird in die Familie der Pseudomonadaceen eingeordnet. In der vorliegenden Arbeit konnte eindeutig gezeigt werden, daß diese Spezies in ihrem ribosomalen Proteinmuster mehr Übereinstimmungen mit den Enterobacteriaceen als mit den Pseudomonadaceen zeigt. Vergleicht man das ribosomale Proteinmuster von Aeromonas punctata mit dem von Plesiomonas shigelloides, so lassen sich manche Übereinstimmungen auch mit den Elektropherogrammen der Enterobacteriaceen feststellen, die man durch einen direkten Vergleich der ribosomalen Proteine von Aeromonas punctata mit denen der Enterobacteriaceen nicht geschlossen hätte (z.B. die Proteine L22, L23, L25 Abb. 9). Plesiomonas shigelloides scheint demnach einen Platz zwischen den Enterobacteriaceen und den Pseudomonadaceen einzunehmen, wobei es jedoch auf Grund seiner ribosomalen Proteine eher den Enterobacteriaceen zuzurechnen wäre.

Die ribosomalen Proteinmuster der meisten Bacillen unterscheiden sich erheblich in ihrer elektrophoretischen Wanderung. Von allen untersuchten Bacillen wiesen nur B.subtilis und B.licheniformis ähnliche Proteinmuster auf. Auf Grund ihrer physiologischen und morphologischen Eigenschaften sollte man eine größere Verwandtschaft dieser beiden Spezies auch annehmen (Stanier et al. 1970). Die eigenen Untersuchungen stimmen gut mit Befunden von Otaka et al. (1968) überein, der mittels säulenchromatischer Auftrennung der ribosomalen Proteine fast gar keine Übereinstimmungen zwischen B.subtilis, B.cereus und B.megaterium fand. Auch die sehr unterschiedlichen GC-Gehalte weisen auf die starke Heterogenität der Bacillen hin.

Die Clostridien weisen keine so großen Unterschiede in ihrem GC-Gehalt auf (Marmur et al. 1963). Da viele Clostridienarten in der Kultur eine große Variabilität in ihrem biochemischen Verhalten zeigen (Wildführ 1949), ist eine Unterscheidung der einzelnen Spezies oft nur schwer möglich. So ist eine Unterscheidung zwischen Clostridium sporogenes, Clostridium septicum und Clostridium chauvoi am genauesten auf Grund der somatischen Antigene möglich (Moussa 1959). Auch die verschiedenen Typen von Clostridium perfringens werden auf Grund der antigenen Spezifität ihrer Toxine voneinander getrennt (Oakley und Warrack 1963).

Obgleich die ribosomalen Proteine einiger Clostridien sich grundlegend in ihrer elektrophoretischen Wanderung voneinander unterscheiden, war eine Trennung der verschiedenen Typen von Clostridium perfringens und eine Unterscheidung von Clostridium sporogenes und Clostridium septicum auf Grund der zweidimensionalen Gelelektrophorese nicht möglich.

Der Vergleich der Proteine verschiedener Spezies stellt nicht nur eine Bereicherung der Taxonomie dar, sondern er kann Hinweise auf den Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion der Proteine geben. Ein Vergleich der Primärsequenzen von Cytochrom C und Hämoglobin z.B. ermöglichte wertvolle Schlüsse auf die Wirkungsweise dieser Proteine. Da Ribosomen in Zellen von Prokaryonten und Eukaryonten

vorkommen, können vergleichende Untersuchungen sowohl an Bakterien als auch an Primaten durchgeführt werden. Es ist zu erwarten, daß homologe Strukturen an den ribosomalen Proteinen von Prokaryonten und Eukaryonten vorkommen.

II. Spezielle Untersuchungen an einzelnen ribosomalen Proteinen verschiedener Bakterienspezies.

A. Protein "L2"

In E.coli ist die Funktion für zahlreiche ribosomale Proteine bekannt: z.B. bindet das E.coli Protein L2 an die 23S RNA (Stöffler et al. 1971b). Das B.stearothermophilus Protein B-L3 bindet ebenfalls an die 23S RNA und zeigt außerdem Kreuzreaktion mit E.coli L2. Im Gegensatz zu E.coli bleibt nach Extraktion der ribosomalen Proteine mit LiCl und Harnstoff das Protein B-L3 von B.stearothermophilus an die 23S RNA gebunden (Erdmann et al. 1971). In der vorliegenden Arbeit sollte gezeigt werden, daß die zu L2 homologen Proteine in verschiedenen Bacillaceen und in E.coli ähnliche strukturelle und funktionelle Eigenschaften aufweisen.

1. "L2" in der zweidimensionalen Gelelektrophorese.

Die elektrophoretische Auftrennung der ribosomalen Proteine nach Essigsäureextraktion zeigt meist große Unterschiede innerhalb der Bacillaceen als auch im Vergleich der Bacillaceen mit E.coli (s. Teil I). Ein Proteinfleck jedoch wanderte bei allen untersuchten Bacillaceen stets ungefähr an der gleichen Stelle wie E.coli L2 (Abb. 11, 14-16). Elektrophoretische Auftrennung der ribosomalen Proteine aus den Untereinheiten zeigte, daß dieses Protein "L2" dem 50S Partikel angehört (Abb. 12).

Die ribosomalen Proteine von E.coli, B.stearothermophilus, B.subtilis, B.licheniformis, B.coagulans, B.circulans, B.pumilis und Clostridium sporogenes wurden mit Harnstoff und LiCl extrahiert und anschließend auf der Standard zweidimensionalen Gelelektrophorese untersucht. Im Gegensatz zu E.coli fehlte das Protein "L2" bei allen untersuchten Bacillaceen (Abb. 19), außerdem waren einige weitere Proteine in deutlich geringerer Konzentration vorhanden. Um herauszufinden, ob bei den Bacillaceen einige ribosomale Proteine bei LiCl-Harnstoff Extraktion an die RNA gebunden bleiben, wurde eine Nachextraktion mit Essigsäure durchgeführt und der Überstand in der Standard zweidimensionalen Gelelektrophorese auf seinen

Tabelle 11: Molekulargewichte der ribosomalen Proteine "L2" verschiedener Bakterienspezies.

Bakterienstamm	Molekulargewicht
Escherichia coli	32.000
B.stearothermophilus	33.200
B.subtilis	33.000
B.circulans	31.800
B.coagulans	33.900
B.cereus	32.800
B.brevis	31.800
B.licheniformis	32.800
B.pumilis	33.000
Clostridium sporogenes	32.600

Die Bestimmung der Molekulargewichte erfolgte mittels SDS zweidimensionaler Gelelektrophorese.

Proteingehalt untersucht. Während bei E.coli keine Proteine in diesem Überstand vorhanden waren, enthielt der Überstand aller untersuchten Bacillaceen bis zu vier Proteine (Abb. 20). Eines davon war stets das Protein "L2".

2. Die Molekulargewichte von "L2" in verschiedenen Bakterienspezies

Zweidimensionale Gelelektrophoresen in Gegenwart von SDS zeigten, daß das Protein "L2" sich im Molekulargewicht von dem Protein L2 in E.coli nur geringfügig unterscheidet (Tabelle 11). Das Molekulargewicht von "L2" liegt zwischen 31.800 (B.circulans und B.brevis) und 33.900 (B.coagulans). Diese geringen Molekulargewichtsunterschiede liegen knapp an der Fehlergrenze der SDS-Methode und deuten daher eher auf eine Verwandtschaft zwischen den "L2" Proteinen der verschiedenen Bakterienspezies hin.

3. Aminosäurezusammensetzungen von "L2" aus verschiedenen Bacillaceen.

Das Protein "L2" wurde aus B.stearothermophilus, B.coagulans und B.licheniformis durch Essigsäurebehandlung des RNA-Proteinkomplexes isoliert. Auf Grund seines hohen Molekulargewichtes kann "L2" leicht mittels Gelfiltration von den anderen RNA-gebundenen Proteinen getrennt werden.

Die Aminosäurezusammensetzungen der Proteine "L2" sind in Tabelle 12 aufgeführt. Die Aminosäureanalysen von E.coli L2 wurden in drei verschiedenen Laboratorien durchgeführt (diese Ergebnisse sind in Tabelle 12 als Vergleich angegeben), so daß auf Grund der Abweichungen bei E.coli eine Bestimmung der Fehlergrenze möglich ist.

Alle Aminosäurezusammensetzungen zeigen eine sehr große Ähnlichkeit miteinander (Tabelle 12). Der Hauptunterschied zwischen E.coli L2 und "L2" von B.stearothermophilus ist der Gehalt an Valin und Isoleucin (Tabelle 12), während E.coli gegenüber B.licheniformis und B.coagulans mehr Unterschiede aufweist. Alle Bacillaceen weisen gegenüber E.coli einen auffallend höheren Gehalt an Isoleucin auf (Tabelle 12).

Die Aminosäurezusammensetzungen von B.licheniformis und B.coagulans zeigen die größten Übereinstimmungen. Der einzige größere Unterschied besteht darin, daß "L2" von B.licheniformis weniger Leucin und mehr Prolin enthält als "L2" von B.coagulans. B.stearothermophilus weist gegenüber den beiden anderen Bacillaceen etwa genauso viele Unterschiede auf wie gegenüber E.coli.

Diese gute Übereinstimmung in den Aminosäurezusammensetzungen deutet darauf hin, daß zwischen dem Protein L2 von E.coli und den Proteinen "L2" der Bacillaceen eine Verwandtschaft besteht. Immunologische Experimente wurden zur Bestätigung dieser Verwandtschaft und zur weiteren Charakterisierung der Proteine "L2" durchgeführt.

Tabelle 12: Aminosäurezusammensetzung des Proteins "L2"

Amino-säure	Escherichia coli +	++	+++	B.st.th.	B.lich.	B.coag.
Asp	9.2	9.3	9.3	9.4	9.8	10.3
Thr	5.5	4.9	5.3	4.8	5.0	5.7
Ser	4.3	4.0	3.8	4.1	4.5	4.1
Glu	7.1	6.8	7.0	7.6	10.1	10.0
Pro	6.2	5.6	6.1	5.8	7.9	6.0
Gly	12.6	12.2	12.7	11.8	10.5	9.3
Ala	8.6	8.0	8.0	6.7	5.9	7.0
Val	9.0	8.6	9.2	6.1	7.0	6.7
Met	2.3	1.4	1.8	2.3	1.4	1.9
Ile	3.8	3.7	4.1	8.6	7.0	6.7
Leu	5.3	5.7	5.7	6.4	6.5	7.9
Tyr	2.3	2.1	2.3	2.5	3.1	3.1
Phe	1.5	1.8	1.6	1.5	1.4	1.9
His	3.1	3.6	3.2	2.2	2.3	2.2
Lys	8.8	10.5	9.1	10.8	9.8	9.3
Arg	10.5	11.5	10.7	9.0	8.0	8.0

Die Angaben sind in Mol%. Die Werte für E.coli L2 stammen aus:
+ Kaltschmidt et al. 1970b
++ Mora et al. 1971
+++ Pearson et al. 1972.
Korrekturen sind für die eigenen Werte und für die Werte von Kaltschmidt et al. (1970b) gemacht.

4. Immunologische Untersuchungen.

In Doppeldiffusionstesten zeigte Anti E.coli L2 Serum Kreuzreaktion mit "L2" von allen untersuchten Bacillaceen, d.h. zwischen diesen Proteinen besteht eine strukturelle Verwandtschaft. In allen Fällen handelte es sich jedoch nur um eine partielle Kreuzreaktion, was an der starken Spurbildung zu erkennen ist (Abb. 21a). Die Bacillaceen untereinander jedoch zeigten mit Anti E.coli L2 Serum eine vollständige Fusion.

Die Proteine "L2" der Bacillaceen zeigten untereinander größere Übereinstimmungen als mit E.coli L2: B.subtilis, B.licheniformis und B.coagulans gaben mit Anti "L2" B.stearothermophilus Serum fast vollständige Kreuzreaktion (Abb. 21b). Das gleiche Serum zeigte nur partielle Kreuzreaktion mit "L2" von B.pumilis, B.circulans, B.cereus und B.brevis (Abb. 21c). Alle Bacillen bildeten gegenüber Clostridium sporogenes einen deutlichen Spur aus.

Alle untersuchten Proteine "L2" reagierten ausschließlich mit Anti E.coli L2 Serum und keinem der übrigen Anti E.coli Einzelproteinseren.

B. Die Proteine "L7" und "L12".

Die Energie für die Translokation bei Verlängerung der Peptidkette wird wahrscheinlich durch Spaltung von GTP in GDP und anorganisches Phosphat gewonnen (Lipmann 1969). Diese Spaltung erfolgt durch Zusammenwirken von Ribosom und G-Faktor; weder G-Faktor noch gereinigte Ribosomen allein können die GTP-Hydrolyse katalysieren (Nishizuka und Lipmann 1966). Wie gezeigt werden konnte, spielt für die GTP-Hydrolyse ausschließlich die 50S Untereinheit eine Rolle (Bodley und Lin 1970), und die ribosomalen Proteine L7 und L12 sind für die Bindung von GTP in Gegenwart von G-Faktor und damit für die GTP-Hydrolyse von großer Bedeutung (Hamel und Nakamoto 1971; Kisha et al. 1971).

Für verschiedene Bakterienspezies wurden Teste zur EF-G abhängigen GTP-Bindung und zur Poly-U abhängigen Poly-Phe Synthese durchgeführt. In Tabelle 13 ist die Aktivität der verschiedenen Bakterienribosomen bei diesen Testen im Vergleich zu E.coli aufgeführt. Zu Beginn der Untersuchungen war sichergestellt worden, daß die Überstandsenzyme in der Poly-U abhängigen Poly-Phe Synthese austauschbar sind, so daß stets mit Überstandsenzymen von E.coli gearbeitet werden konnte. Für die GTP-Bindungsteste wurde stets gereinigter G-Faktor von E.coli eingesetzt.

Die mit E.coli nur wenig verwandten Bacillaceen zeigten einen sehr geringen Poly-Phe Einbau. Zugabe von E.coli 30S Partikeln erhöhte den Poly-Phe Einbau jedoch beträchtlich (Tabelle 13). Daraus muß man schließen, daß die 30S Untereinheiten der Bacillaceen relativ inaktiv sind. Ähnliches wurde auch von Erdmann et al. (1973) für B.stearothermophilus gefunden. Die EF-G abhängige GTP-Bindung ist dagegen ausschließlich von der 50S Untereinheit abhängig (Bodley und Lin 1970). Erwartungsgemäß ergab die Zugabe von E.coli 30S Partikeln zu B.stearothermophilus Ribosomen keine höhere G-Faktor abhängige GTP-Bindung.

Um Strukturhomologien zwischen "L7/L12" der verschiedenen Bakterienspezies festzustellen, wurden Präzipitationsteste mit Anti E.coli 70S und Anti E.coli L7/L12 Serum durchgeführt (Tabelle 14, Spalte

2 und 3). Die Kreuzreaktion mit Anti E.coli L7/L12 Serum war gleich oder eher höher als die allgemeine Kreuzreaktion mit Anti E.coli 70S Serum. Lediglich bei Aeromonas punctata lag die allgemeine Kreuzreaktion deutlich über der Kreuzreaktion mit Anti L7/L12 Serum. Für die nahe verwandten Enterobacteriaceen zeigte sich mit beiden Seren eine deutlich reduzierte Kreuzpräzipitation, während die entfernt verwandten Bacillaceen z.T. nur noch 20 - 30 % Kreuzreaktion aufwiesen. Aus diesen Präzipitationstesten muß man schließen, daß in entfernt verwandten Spezies die Strukturhomologien der ribosomalen Proteine im allgemeinen als auch der Proteine "L7/L12" nur noch gering sind.

Obgleich die Aktivitäten der Ribosomen in der EF-G abhängigen GTP-Bindung und in der Poly-U abhängigen Poly-Phe Synthese teilweise sehr gering waren (Tabelle 13), wurden Inhibitionsteste mit Anti E.coli L7/L12 IgG bzw. Fab durchgeführt (Tabelle 14, Spalte 4 und 5). Typische Inhibitionskurven der Poly-U abhängigen Poly-Phe Synthese und der EF-G abhängigen GTP-Bindung sind in Abbildung 22 für einige Bakterienspezies dargestellt.

Während in den Präzipitationstesten bereits innerhalb der Enterobacteriaceen eine deutlich geringere Kreuzreaktion auftrat, betrug die Inhibition bei der Poly-U abhängigen Poly-Phe Synthese als auch im EF-G abhängigen GTP-Bindungstest für alle Enterobacteriaceen und sogar für Plesiomonas shigelloides und Aeromonas punctata 100% (Tabelle 14). Die Kreuzreaktion zwischen Anti E.coli L7/L12 Serum und den Ribosomen von Vibrio cuneatus, B.pumilis, B.subtilis und B.stearothermophilus betrug nur ca. 36 - 38 %. Bei der Inhibition der ribosomalen Funktionen durch IgG des gleichen Serums dagegen zeigte das Serum eine 2-3fach höhere Wirkung als im Präzipitationstest. Diese Ergebnisse machen deutlich, daß trotz der großen Unterschiede in den ribosomalen Proteinen der verschiedenen Spezies bestimmte Strukturen, die für die Funktion des Ribosoms eine wichtige Rolle spielen, während der Evolution bewahrt blieben. Aus diesem Grunde sollte untersucht werden, ob die L7/L12 Homologen auch zwischen entfernt verwandten Bakterienspezies funktionell austauschbar sind.

Tabelle 13: Die Aktivität der Ribosomen verschiedener Bakterienspezies in der EF-G abhängigen GTP-Bindung und in der Poly-U abhängigen Poly-Phe Synthese im Vergleich zu E.coli.

Bakterienspezies	EF-G abhängige GTP-Bindung %	Poly-U abhängige Poly-Phe Synthese %	
E.coli	100	100	
Proteus vulgaris	56	24	
Erwinia carotovora	87	62	
Serratia marcescens	56	41	
Plesiomonas shigelloides	15	56	
Aeromonas punctata	58	53	
Vibrio cuneatus	37	47	
Bacillus pumilis	35	2	(95§)
Bacillus stearothermophilus	24	25	(75§)
Bacillus subtilis	31	4	(76§)

§ Zugabe von E.coli 30S Partikeln

Tabelle 14: Vergleich zwischen Präzipitationstesten und Inhibitionstesten mit Anti E.coli L7/L12

Bakterienstamm	Präzipitationsteste		Inhibitionsteste mit Anti L7/L12	
	Anti E.coli 70S	Anti E.coli L7/L12	Poly-U abhängige Poly-Phe Synthese	EF-G abhängige GTP-Bindung
	%	%	%	%
E.coli	100	100	100	100
Proteus	76	91	n.d.	100
Erwinia	82	81	100	95
Serratia	85	100	n.d.	99
Plesiomonas	61	67	100	100
Aeromonas	50	36	100	100
Vibrio	37	36	76	80
B.pumilis	18	26	n.d.	92
B.st.th.	30	38	70	78
B.subtilis	22	36	74	83

Die Inhibitionsteste der Poly-U abhängigen Poly-Phe Synthese wurden mit IgG und die der EF-G abhängigen GTP-Bindung mit Fab durchgeführt.

Durch Behandlung mit Äthanol und 1 M NH_4Cl in der Kälte können die Proteine L7/L12 von dem E.coli Ribosom abgespalten werden (s. Material und Methoden). Die daraus resultierenden PI-Partikel zeigen eine stark verminderte GTP-Bindung von 10 - 15% (Tabelle 15). Die Ribosomen von Plesiomonas shigelloides, B.pumilis , B.subtilis und B.stearothermophilus wurden ebenfalls in der Kälte mit Äthanol und 1 M NH_4Cl behandelt, die GTP-Bindung der resultierenden PI-Partikel betrug jeweils nur noch 10 - 20 % der ursprünglichen Aktivität.

Fügt man den PI-Partikeln von E.coli die abgespaltenen Proteine L7/L12 wieder zu, so wird die Fähigkeit zur GTP-Bindung vollständig wiederhergestellt (Tabelle 15). Wurden die PI-Proteine von E.coli durch PI-Proteine anderer Herkunft ersetzt, so konnte die Fähigkeit zur GTP-Bindung ebenfalls fast vollständig wieder hergestellt werden (Tabelle 15), d.h. die ribosomalen Proteine "L7/L12" verschiedener Herkunft waren in allen Fällen mit E.coli L7/L12 funktionell austauschbar.

Die PI-Partikel bzw. PI-Proteine verschiedener Bakterienspezies wurden in der Standard zweidimensionalen Gelelektrophorese untersucht (Abb. 23). Die Abbildung macht deutlich, daß in B.stearothermophilus zwei Proteine vom Ribosom abgespalten wurden. Da es sich bei dem basischen Protein jedoch um ein Protein der 30S Untereinheit handelt, kann es für die EF-G abhängige GTP-Bindung keine Rolle spielen.

In B.stearothermophilus erscheint das Protein "L7/L12" in der zweidimensionalen Gelelektrophorese als Doppelspot, was bei höheren Auftragsmengen besonders deutlich wird. In B.subtilis entspricht den ribosomalen E.coli Proteinen L7/L12 das Protein BL9 (Abb. 11 und 23). Dieses Protein erscheint bei B.subtilis, B.pumilis und B.licheniformis jedoch nur als einzelner Proteinfleck auf der zweidimensionalen Gelelektrophorese. Ob es in diesen Bacillus Spezies zu keiner Acetylierung von "L7" kommt oder ob etwa sämtliche "L7/L12" Moleküle an der NH_2-terminalen Aminosäure acetyliert sind, ist bisher nicht geklärt und bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Tabelle 15: Wiederherstellung der EF-G abhängigen GTP-Bindungsaktivität der E.coli PI-Partikel durch Zugabe von PI-Proteinen verschiedener Herkunft.

PI-Partikel	Herkunft der PI-Proteine	(^{3}H) GTP-Bindung in cpm	
		-PI	+PI
E.coli	E.coli	1.404	12.600
E.coli	Plesiomonas	2.002	8.812
E.coli	B.pumilis	1.624	11.898
E.coli	B.subtilis	2.042	8.606

Diskussion zu II.

Vergleichende Untersuchungen an ribosomalen Komponenten verschiedener Spezies bezogen sich bisher fast ausschließlich auf die Struktur der einzelnen Komponenten und erfaßten die Unterschiede meist qualitativ. Während durch Sequenzbestimmungen ribosomaler RNA Aussagen über Veränderungen in den einzelnen Nucleotiden gemacht werden konnten (Larsen et al. 1970; Ehresmann et al. 1972), sind die Untersuchungen an ribosomalen Proteinen noch nicht so weit fortgeschritten. Mit Hilfe von Säulenchromatographie (Otaka et al. 1968) und zweidimensionaler Gelelektrophorese (Kaltschmidt und Wittmann 1970a+b) kann man zwar feststellen, ob einzelne Proteine verändert sind, über die Art der Veränderung und ihre Auswirkung auf die Funktion des Ribosoms kann dabei nichts gesagt werden. Nomura et al. (1968) haben als erste hybride 30S Partikel aus den Komponenten verschiedener Bakterienspezies rekonstituiert. Sehr viel weiter führten die neuesten Experimente von Higo et al. (1973), in denen einzelne ribosomale 30S Proteine im E.coli Rekonstitutionssystem durch Proteine von B.stearothermophilus ersetzt werden konnten. Derartige Versuche geben uns die Möglichkeit, mehr über die Funktion der ribosomalen Komponenten zu erfahren und diese Funktionen bestimmten Abschnitten der einzelnen Komponenten zuzuordnen.

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, zeigen die ribosomalen Proteine "L2" neben einer strukturellen auch eine funktionelle Homologie: Die Proteine "L2" binden ebenso wie E.coli L2 spezifisch an die 23S RNA. L2 von E.coli bindet an E.coli 23S RNA ebensogut wie an B.stearothermophilus 23S RNA (Stöffler et al. 1971a), während "L2" von B.stearothermophilus an die heterologe RNA sehr viel schwächer bindet als an die homologe RNA.

Im Gegensatz zu E.coli bleiben die "L2" Proteine der Bacillaceen nach Extraktion mit 4 M Harnstoff und 2 M LiCl an die RNA gebunden. Dabei blieb "L2" von B.stearothermophilus am stärksten an die RNA gebunden, während die "L2" der anderen Bacillaceen bei LiCl-Harnstoff Extraktion teilweise von der RNA dissoziierten. Möglicherweise spielt die ausgeprägte RNA Bindung des "L2" Proteins in B.

stearothermophilus auch bei der 50S Rekonstitution (Nomura und Erdmann 1970) eine große Rolle. Zusätzlichen Einblick in die Funktion des "L2" von B.stearothermophilus könnte man durch Rekonstitutionsexperimente gewinnen, indem das B.stearothermophilus "L2" durch heterologe "L2" ersetzt würde. Auch könnte man durch derartige Austauschexperimente klären, ob die starke Bindungskraft des B.stearothermophilus "L2" hauptsächlich auf Veränderungen in der RNA, in dem Protein oder in beiden zurückzuführen ist.

Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit für verschiedene Bakterienspezies an den ribosomalen Proteinen "L7/L12" gezeigt werden, daß trotz großer struktureller Unterschiede eine funktionelle Austauschbarkeit dieser Proteine möglich war. An Hand der zweidimensionalen Gelelektrophorese war gezeigt worden, daß in allen Enterobacteriaceen an der Stelle von L7/L12 Doppelpunkte sichtbar sind (s. Teil I). Daraus darf man schließen, daß die L7/L12 Homologen der Enterobacteriaceen ebenfalls eine Acetylierung oder andere Modifikation des N-Terminus enthalten. Weiterhin konnte jedoch gezeigt werden, daß in drei untersuchten Bacillaceen die L7/L12 Homologen als ein Punkt auf der Standard zweidimensionalen Gelelektrophorese wandern und daher einen homologen NH_2-Terminus besitzen müssen. Ob alle Moleküle unmodifiziert vorliegen oder ob sie alle gleichartig modifiziert sind wurde nicht geklärt.

Wenn bei den Bacillen keine NH_2-terminale Acetylierung eines ribosomalen Proteins für die EF-G abhängige GTP-Bindung nötig ist, muß man sich fragen, welche Rolle sie bei den Enterobacteriaceen und anderen Bakterienspezies für die Funktion des Ribosoms spielt. Da in funktionellen Testen die ribosomalen Proteine L7/L12 von E.coli durch die homologen Proteine der Bacillaceen ersetzt werden konnten, spielt die Acetylierung des L7 vielleicht für eine andere Funktion des Ribosoms eine Rolle, nicht jedoch für die EF-G abhängige GTP-Bindung.

Die vorliegenden Untersuchungen an einzelnen ribosomalen Proteinen verschiedener Bakterienspezies tragen zum Verständnis der Funktion

dieser Proteine bei. Im Zusammenhang mit den allgemeinen elektrophoretischen und immunologischen Methoden zeigen die vorliegenden Ergebnisse zahlreiche Wege auf, deren weitere Erforschung zum Verständnis von Struktur und Funktion des Bakterienribosoms führen könnte.

Zusammenfassung

Die ribosomalen Proteine verschiedener Enterobacteriaceen, Bacillaceen und einiger Pseudomonadaceen wurden mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese und immunologischer Methoden miteinander und mit den ribosomalen Proteinen von E.coli verglichen. Innerhalb der Enterobacteriaceen zeigten sich auf Grund beider Methoden große Übereinstimmungen im ribosomalen Proteinmuster. Zwischen den ribosomalen Proteinen von E.coli und Shigella dispar wurde sogar nur ein einziges Protein verändert gefunden.

Plesiomonas shigelloides, dessen taxonomische Zuordnung innerhalb der Pseudomonadaceen umstritten ist, zeigte in seinen ribosomalen Proteinen eine deutliche Verwandtschaft mit der Familie der Enterobacteriaceen.

Die ribosomalen Proteine der Bacillaceen zeigten mit E.coli und auch untereinander nur wenig Übereinstimmungen auf der zweidimensionalen Gelelektrophorese. Mittels immunologischer Methoden konnten jedoch eindeutig Strukturhomologien zwischen den ribosomalen Proteinen von E.coli und denen der Bacillaceen nachgewiesen werden.

In zwei Fällen konnten die ribosomalen Proteine entfernt verwandter Spezies denen von E.coli eindeutig zugeordnet werden: Es wurde gezeigt, daß das ribosomale Protein "L2" aus verschiedenen Bacillaceen dem E.coli L2 strukturell und funktionell homolog ist. Die zu E.coli L7/L12 homologen Proteine wurden in mehreren Bakterienspezies bestimmt und ihre funktionelle Austauschbarkeit mit E.coli L7/L12 gezeigt.

Literaturverzeichnis

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1957). The Williams & Wilkins Company, Baltimore.

Birge, E.A. und Kurland, C.G. (1969). Altered ribosomal protein in streptomycin-dependent Escherichia coli. Science 166, 1282.

Birge, E.A., Craven, G.R., Hardy, S.J.S., Kurland, C.G. und Voynow, P. (1969). Structural determinant of a ribosomal protein: K locus. Science 164, 1285.

Blackburn, S. (1968). Amino acid determination. Marcel Dekker, Inc., New York.

Bodley, J.W., Zieve, F.J., Lin,L. und Zieve, S.T. (1969). Formation of the ribosome-G-factor-GDP-complex in the presence of fusidic acid. Biochem. Biophys. Res. Commun. 37, 437.

Bodley, J.W. und Lin, L. (1970). Studies on the nature of the G-factor binding site on the 50S ribosomal subunit. Biochemistry 11, 782.

Braunitzer, G. (1960). Vollautomatische, quantitative Aminosäure-Bestimmung. Angew.Chemie 72, 485.

Brenner, D.J., Fanning, G.R., Johnson, R.E., Citarella, R.V. und Falkow, S. (1969). Polynucleotide sequence relationship among members of Enterobacteriaceae. J.Bacteriol. 98, 637.

Brownlee, G.C. und Sanger, F. (1967). Nucleotide sequences from low molecular weight ribosomal RNA of E.coli. J.Mol.Biol. 23, 337.

Denney, R.M. und Yankofsky, C. (1972). Detection of tryptophan messenger RNA in several bacterial species and examination of the properties of heterologous DNA-RNA hybrids. J.Mol.Biol. 64, 319.

Dzionara, M., Kaltschmidt, E., und Wittmann, H.G. (1970). Ribosomal proteins XIII. Molecular weights of isolated ribosomal proteins of E.coli. Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 67, 1909.

Ehresmann, C., Fischel, J.L., Fellner, P. und Ebel, J.-P. (1972). Studies on the primary structure of the 16S ribosomal RNA of Escherichia coli and Proteus vulgaris. FEBS Symposium 23, 41.

Erdmann, V.A., Fahnestock, S. und Nomura, M. (1971). Reconstitution of 50S ribosomes from 23S and 5S RNA and protein components. Fed.Proc. 30, 1203.

Erdmann, V.A., Fahnestock, S. und Nomura, M. (1973). Reconstitution of 50S ribosomal subunits from B.stearothermophilus. Methods in Enzymology, im Druck.

Fellner, P. (1971). The primary structure of the 16S and 23S ribosomal RNAs. Biochemie 53, 573.

Fellner, P., Ehresmann, C. und Ebel, J.-P. (1972). The determination of the primary structure of the 16S ribosomal RNA of Escherichia coli I - Nucleotide sequence analysis of T_1 and pancreatic ribonuclease digestion products. Biochemie 54, 853.

Ferguson, W.W. und Henderson, N.D. (1947). Description of strain C27: Organism with the major antigen of Shigella sonnei phase I. J.Bacteriol. 54, 179.

Hamel, E., Koka, M. und Nakamoto, Z. (1971). Requirement of an Escherichia coli 50S ribosomal protein component for effective interaction of the ribosome with T and G factors and with guanosine triphosphat. J.Biol.Chem. 247, 805.

Hardy, S.J.S. und Kurland, C.G. (1966). The relationship between poly A polymerase and the ribosome. Biochemistry 5, 3676.

Hardy, S.J.S., Kurland, C.G., Voynow, P. und Mora, G. (1969). The

ribosomal proteins of Escherichia coli I. Purification of the 30S ribosomal proteins. Biochemistry 8, 2897.

Heidelberger, M. (1939). Quantitative absolute methods in the study of antigen-antibody reactions. Bact.Rev. 3, 49.

Higo, K., Held, W., Kahan, L. und Nomura, M. (1973). Functional correspondence between 30S ribosomal proteins of Escherichia coli and Bacillus stearothermophilus. Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 70, 944.

Hindennach, I., Stöffler, G. und Wittmann, H.G. (1971). Ribosomal proteins. Isolation of the proteins from 30S ribosomal subunits of Escherichia coli. Europ.J.Biochem. 23, 7.

Horne, J.R. und Erdmann, V.A. (1972). Isolation and characterization of 5S RNA-protein complexes from Bacillus stearothermophilus and Escherichia coli ribosomes. Molec.Gen.Genet. 119, 337.

Kabat, E.A. (1961). Kabat and Mayer's experimental immunochemistry. Springfield.

Kaltschmidt, E. und Wittmann H.G. (1970a). Ribosomal proteins VII. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis for fingerprinting of ribosomal proteins. Anal.Biochem. 36, 401.

Kaltschmidt, E. und Wittmann, H.G. (1970b). Ribosomal proteins XII. Number of proteins in small and large ribosomal subunits of E.coli as determined by two-dimensional gel electrophoresis. Proc.Nat.Acad. Sci.U.S. 67, 1276.

Kaltschmidt, E., Stöffler, G., Dzionara, M. und Wittmann, H.G. (1970a). Ribosomal proteins XVII. Comparative studies on ribosomal proteins of four strains of E.coli. Molec.Gen.Genet. 109, 303

Kaltschmidt, E., Dzionara, M. und Wittmann, H.G. (1970b). Ribosomal proteins XV. Amino acid composition of isolated ribosomal proteins from 30S and 50S subunits of E.coli. Molec.Gen.Genet. 109, 292.

Kaltschmidt, E. und Wittmann, H.G. (1972). Ribosomal proteins XXXII. Comparison of several extraction methods for proteins from Escherichia coli ribosomes. Biochemie 54, 167.

Kischa, K., Möller, W. und Stöffler, G. (1971). Reconstitution of a GTPase activity by a ribosomal protein from E.coli. Nature 233, 62.

Kurland, C.G. (1972). Strukture and function of the bacterial ribosome. Ann.Rev.Biochem. 41, 377.

Larsen, C.J., Lebowik, P., Weissman, S.M. und DuBuy, B. (1970). Studies of the primary structure of low molecular weight ribonucleic acid other than t-RNA. Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol. 35, 35.

Leboy, P.S., Cox, E.C. und Flaks, J.G. (1964). The chromosomal site specifiying a ribosomal protein in Escherichia coli. Proc. Nat.Acad.Sci.U.S. 52, 1367.

Lipmann, F. (1969). Polypeptide chain elongation in protein biosynthesis. Science 164, 1024.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. und Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J.Biol.Chem. 193, 265.

Luria, S.E. und Burrous, J.W.J. (1957). Hybridisation between Escherichia coli and Shigella. J.Bacteriol. 74, 461.

Lutter, L.C., Zeichhardt, H., Kurland, C.G. und Stöffler, G. (1972). Ribosomal protein neighborhoods I. S18 and S21 as well as S5 and S8 are neighbors. Molec.Gen.Genet. 119, 357.

McCarthy, B.J. und Bolton, E.T. (1963). An approach to the measure of genetic relatedness among organisms. Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 50, 156.

Marmur, J., Falkow, S. und Mandel, M. (1963). New approaches to bacterial taxonomy. Ann.Rev.Microbiol. 17, 329.

Martini, O.H.W. und Gould, H.J. (1971). Enumeration of rabbit reticulocyte ribosomal proteins. J.Mol.Biol. 62, 403.

Mejbaum, W.Z. (1939). Über die Bestimmung kleiner Pentosemengen, insbesondere in Derivaten der Adenylsäure. Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 258, 117.

Midgeley, J.E.M. (1962). The nucleotide base composition of RNA from several microbial species. Biochim.Biophys.Acta 61, 513.

Miura, K.J. (1962). The nucleotide composition of RNA's of soluble and particle fractions in several species of bacteria. Biochim. Biophys.Acta 55, 62.

Mizushima, S. und Nomura, M. (1970). Assembly mapping of 30S ribosomal proteins from E.coli. Nature 226, 1214.

Mora, G., Thammana, P., Donner, D., Lutter, L., Craven, G.R. und Kurland, C.G. (1971). Isolation and characterization of 50S ribosomal proteins of E.coli B. Molec.Gen.Genet. 112, 229.

Moussa, R.S. (1959). Antigenic formulae for Clostridium septicum and Clostridium chauvoei. J.Path.Bact. 77, 341.

Nirenberg, M.W. und Matthaei, J.H. (1961). The dependence of cell-free protein synthesis in E.coli upon naturally occuring or synthetic polyribonucleotides. Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 47, 1588.

Nishizuka, Y. und Lipmann, F. (1966). The interrelationship between guanosine triphosphatase and amino acid polymerisation. Arch. Biochem.Biophys. 116, 344.

Nomura, M., Traub, P. und Bechmann, H. (1968). Hybrid 30S ribosomal particles reconstituted from components of different bacterial

origins. Nature 219, 793.

Nomura, M. und Erdmann, V.A. (1970). Reconstitution of 50S ribosomal subunits from dissociated molecular components. Nature 228, 744.

Nomura, M. (1973). Assembly of bacterial ribosomes. Science 179, 864.

Oakley, C.L. (1963). Classification of the genus Clostridium. Bull. Off.Int.Epizool. 59, 1411.

Osawa, S., Itoh, T. und Otaka, E. (1971). Differentiation of the ribosomal protein compositions in the genus Escherichia and its related bacteria. J.Bacteriol. 107, 168.

Otaka, E., Itoh, T. und Osawa, S. (1968). Ribosomal proteins of bacterial cells: strain- and species-specificity. J.Mol.Biol. 33, 93.

Ouchterlony, Ö. (1968). Handbook of immunodiffusion and immuno-electrophoresis. Ann Arbor Science Publishers.

Ozaki, M., Mizushima, S. und Nomura, M. (1969). Identification and functional characterization of the protein controlled by streptomycin resistant locus in E.coli. Nature 222, 333.

Pearson, P., Delius, H. und Traut, R.R. (1972). Purification and characterization of 50S ribosomal proteins of Escherichia coli. Europ.J.Biochem. 27, 482.

Reinbolt, J. und Schiltz, E. (1973). The primary structure of ribosomal protein S4 from Escherichia coli. FEBS letters, im Druck.

Stanier, R.Y., Doudoroff, M., und Adelberg, E.A. (1970). The microbial world. Prentice Hall Inc., New Jersey.

Stöffler, G. und Wittmann, H.G. (1971a). Sequence differences of Escherichia coli ribosomal proteins as determined by immunological methods. Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 68, 2283.

Stöffler, G. und Wittmann, H.G. (1971b). Ribosomal proteins XXV. Immunological studies on Escherichia coli ribosomal proteins. J. Mol.Biol. 62, 407.

Stöffler, G., Daya, L., Rak, K.H. und Garrett, R.A. (1971a). Ribosomal proteins XXVI. The number of specific protein binding sites on 16S and 23S RNA of Escherichia coli. J.Mol.Biol. 62, 411.

Stöffler, G., Daya, L., Rak, K.H. und Garrett, R.A. (1971b). Ribosomal proteins XXX. Specific protein binding sites on 23S RNA of Escherichia coli. Molec.Gen.Genet. 114, 125.

Stöffler, G., Hasenbank, R., Lütgehaus, M., Maschler, R., Morrison, C.A., Zeichhardt, H. und Garrett, R.A. (1973). The accessibility of proteins of the E.coli 30S ribosomal subunit to antibody binding. Molec.Gen.Genet. im Druck.

Sun, T., Bickle, T.A. und Traut, R.R. (1972). Similarity in the size and number of ribosomal proteins from different procaryotes. J.Bacteriol. 111, 474.

Sypherd, P.S. (1969). Amino acid differences in a 30S ribosomal protein from two strains of Escherichia coli. J.Bacteriol. 99, 379.

Terhorst, C., Wittmann-Liebold, B. und Möller, W. (1972). 50S ribosomal proteins. Peptide studies on two acidic proteins A_1 and A_2, isolated from 50S ribosomes of Escherichia coli. Europ.J.Biochem. 25, 13.

Terhorst, C., Möller, W., Laursen, R. und Wittmann-Liebold, B. (1973) The primary structure of an acidic protein from 50S ribosomes of Escherichia coli which is involved in GTP hydrolysis dependent on elongation factors G and T. Europ.J.Biochem. 34, 138.

Traub, P. und Zillig, W. (1966). Untersuchungen zur Biosynthese der Proteine, VI: Eine neue Methode zur Darstellung eines zellfreien Systems aus Escherichia coli und deren Eigenschaften in der nuclein-

säureabhängigen Proteinsynthese. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 343, 246.

Traub, P und Nomura, M. (1968). Structure and function of E.coli ribosomes V. Reconstitution of functionally active 30S ribosomal particles from RNA and protein. Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 59, 777.

Voynow, P. und Kurland, C.G. (1971). Stoichiometry of the 30S ribosomal proteins of E.coli. Biochemistry 10, 517.

Waller, J.P. (1964). Fractionation of the ribosomal protein from Escherichia coli. J.Mol.Biol. 10, 319.

Wildführ, G. (1949). On the toxological lability of the gas gangrene organisms in artifical culture. Z.Immun.Forsch. 106, 369.

Wittmann, H.G. und Stöffler, G. (1972). Structure and function of bacterial ribosomal proteins. In "the mechanism of protein synthesis and its regulation. Ed. L. Bosch. North Holland Publishing Company.

Wittmann-Liebold, B. und Wittmann, H.G. (1971). Ribosomal proteins XX. Isolation and analyses of the tryptic peptides of proteins S5 from strain K and B of Escherichia coli. Biochim.Biophys.Acta 251, 44.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Abteilung Wittmann, unter Leitung von Herrn Dr.G.Stöffler hergestellt.

Herrn Dr.G.Stöffler danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit und für die Hilfe, die er mir jederzeit gewährte. Herrn Prof.Dr. H.G.Wittmann danke ich für die großzügige Unterstützung sowie allen Mitarbeitern der Abteilung für ihr freundliches Entgegenkommen.

Lebenslauf

Geboren am 15. August 1947 in Berlin.
Eltern: Prof. Dr. Heinz Meilicke und Ehefrau
Irmgard, geb. Schreiber.
1954-1958 Besuch der Grundschule in Bonn.
1958 Einschulung auf den humanistischen Zweig
der Clara-Schumann Schule.
1961/62 Aufenthalt in England.
November 1966 Ablegung der Reifeprüfung in Bonn.
Winter 1966/67 Sprachaufenthalt in Paris.
Beginn des Biologiestudiums an der Freien Universität
Berlin im Wintersemester 1967/68.
Im Wintersemester 1969/70 Studium am genetischen
Institut in Köln.
Im Juli 1970 Heirat mit Dr. med. Rolf Geisser.
Im August desselben Jahres Beginn der Tätigkeit
am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik
in Berlin.
Im Oktober 1971 Beendigung der Diplomprüfung
mit Abgabe der schriftlichen Diplomarbeit.
Seit November 1971 Tätigkeit an der Dissertation.

Abbildungen

Legenden zu den Figuren:

Fig. 1 Standardkurve zur Bestimmung der Molekulargewichte ribosomaler Proteine. Die Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen ribosomalen Proteine von E.coli wurde gegen ihr Molekulargewicht (Dzionara et al. 1970) semilogarithmisch aufgetragen.

Fig. 2 Standard zweidimensionale Gelelektrophorese der 70S, 50S und 30S Partikel von E.coli K. Die Nomenklatur von Kaltschmidt und Wittmann (1970b) wurde zur Markierung der einzelnen ribosomalen Proteine benutzt. L bedeutet große (large) und S bedeutet kleine (small) Untereinheit.

Fig. 3 Standard zweidimensionale Elektropherogramme der 70S, 50S und 30S ribosomalen Proteine verschiedener Enterobacteriaceen. Die Pfeile markieren einen zusätzlichen Proteinflecken der 50S Untereinheit, der auf dem Elektropherogramm von E.coli nicht auftritt.

Fig. 4 Gesamtribosomale Proteine von E.coli K nach Auftrennung in SDS zweidimensionaler Gelelektrophorese. Die Ordinate gibt das Molekulargewicht der ribosomalen Proteine an.

Fig. 5 Gesamtribosomale Proteine von Serratia marcescens und Proteus vulgaris nach Auftrennung in SDS zweidimensionaler Gelelektrophorese. Die Pfeile markieren die Stelle, an der S7 K erwartet würde.

Fig. 6 Partielle Kreuzreaktion des Proteins S13, auf Grund der Spurbildung (Pfeil). Das mittlere Loch enthält Anti E.coli S13 Serum. A enthält gesamtribosomales Protein von E.coli, B enthält gesamtribosomales Protein von Serratia marcescens.

Fig. 7 Doppeldiffusionstest (Ouchterlony). Das zentrale Loch enthält jeweils 100 µg ribosomales Gesamtprotein von a)Aerobacter aerogenes, b) Salmonella typhimurium. Die peripheren Löcher enthalten jeweils 80 µl E.coli AEPS derjenigen Proteine, die auf den zweidimensionalen Elektropherogrammen gar nicht oder nur sehr schwach sichtbar waren.

Fig. 8 Gesamtribosomale Proteine von Plesiomonas shigelloides nach Auftrennung in Standard zweidimensionaler Gelelektrophorese.

Fig. 9 Gesamtribosomale Proteine von Aeromonas punctata nach Auftrennung in Standard zweidimensionaler Gelelektrophorese. Die ribosomalen Proteine, die denen von E.coli mit einiger Sicherheit zugeordnet werden konnten, sind auf der Abbbildung gekennzeichnet.

Fig. 10 Gesamtribosomale Proteine von Vibrio cuneatus nach Auftrennung in Standard zweidimensionaler Gelelektrophorese. Nur das Protein L2 konnte dem E.coli Protein mit einiger Sicherheit zugeordnet werden.

Fig. 11 Gesamtribosomale Proteine von B.subtilis nach Auftrennung in Standard zweidimensionaler Gelelektrophorese. Die Proteine wurden mit BS1 bis BS21 bzw. BL1 bis BL30 durchnummeriert, entsprechend der Methode, die Kaltschmidt und Wittmann (1970b) für E.coli anwandten. Die ribosomalen Proteine, die E.coli L2 bzw. E.coli L7/L12 homolog sind, sind mit (L2) und (L7/L12) bezeichnet.

Fig. 12 Die ribosomalen Proteine der 30S und 50S Untereinheiten von B.subtilis nach Auftrennung in Standard zweidimensionaler Gelelektrophorese.

Fig. 13 Die ribosomalen Proteine der 30S und 50S Untereinheiten von B.subtilis nach Auftrennung in SDS zweidimensionaler

Gelelektrophorese.

Fig. 14 Die 70S ribosomalen Proteine verschiedener Bacillen nach Auftrennung durch Standard zweidimensionale Gelelektrophorese. Proteine, die den ribosomalen Proteinen von B. subtilis zugeordnet werden konnten, sind entsprechend gekennzeichnet.

Fig. 15 Gesamtribosomale Proteine von Clostridium perfringens Typ A, B, C, D, E und H nach Auftrennung in Standard zweidimensionaler Gelelektrophorese. Unterschiede im Elektropherogramm im Vergleich zu Clostridium perfringens Typ A sind mit Pfeilen markiert.

Fig. 16 Gesamtribosomale Proteine von Clostridium sporogenes und Clostridium pasteurianum nach Auftrennung in Standard zweidimensionaler Gelelektrophorese. Unterschiede im Elektropherogramm sind durch Pfeile markiert.

Fig. 17 Gesamtribosomale Proteine von a) B.circulans, b) B.coagulans und c) B.cereus nach Auftrennung in SDS zweidimensionaler Gelelektrophorese.

Fig. 18 Präzipitationskurven von Anti E.coli 70S (a) und Anti B.subtilis 70S Serum (b) gegen Ribosomen von E.coli und verschiedenen Bacillen.

Fig. 19 Zweidimensionale Gelelektrophorese der 70S ribosomalen Proteine von B.subtilis nach Extraktion mit LiCl und Harnstoff. Der Pfeil markiert die Stelle, an der man "L2" erwarten sollte.

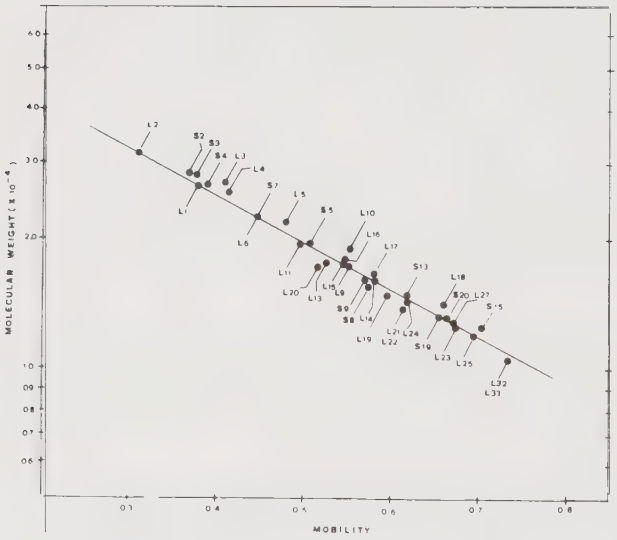
Fig. 20 zweidimensionale Gelelektrophorese der ribosomalen Proteine von B.stearothermophilus, die nach Extraktion mit LiCl und Harnstoff an die RNA gebunden bleiben. In B.stearothermophilus wurden vier Proteine gefunden. Protein "L2", das immunologisch Kreuzreaktion mit E.coli L2 zeigte, ist

auf der Abbildung gekennzeichnet. "L2" entspricht dem Protein B-L3 der B.stearothermophilus Nomenklatur (Horne und Erdmann 1972).

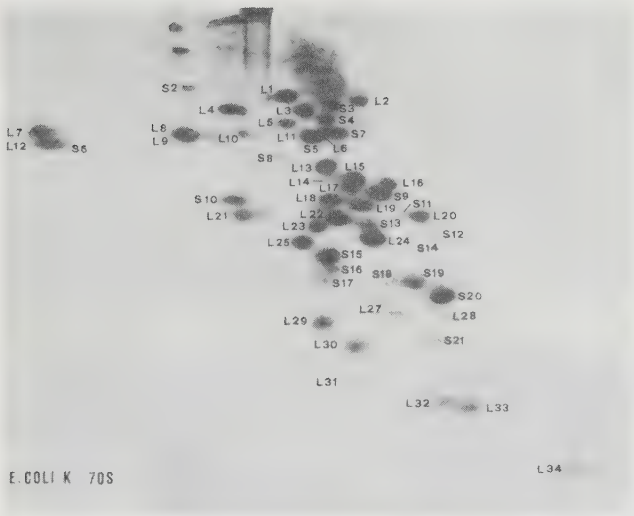
Fig. 21 Doppelte Immundiffusion (Semimakromethode).
a. Zentrum: 100 µl Anti E.coli L2 Serum. Periphere Löcher: 60 µg gesamtribosomales Protein von E.coli in 1 und 4; 300 µg gesamtribosomales Protein von B.brevis in 2; von B.subtilis in 3; von B.circulans in 5; von B.pumilis in 6.
b. Zentrum: 100 µl Anti B.stearothermophilus "L2" Serum. Periphere Löcher: 150 µg gesamtribosomales Protein von B.stearothermophilus in 2, 4 und 6; von B.subtilis in 1; von B.circulans in 3; von B.pumilis in 5.
c. Zentrum wie bei b. Periphere Löcher: 150 µg gesamtribosomales Protein von B.circulans in 1; von B.cereus in 2; von B.brevis in 3; von B.stearothermophilus in 4; von B.pumilis in 5.

Fig. 22 Typische Inhibitionskurven der EF-G abhängigen GTP-Bindung (links) und der Poly-U abhängigen Poly-Phe Synthese (rechts) durch Fab bzw. IgG Antikörper gegen E.coli L7/L12.

Fig. 23 Zweidimensionale Gelelektrophorese der PI-Proteine (a) bzw. der ribosomalen Proteine aus den PI-Partikeln (b-d). Die Pfeile markieren, an welchen Stellen vor Abspaltung der PI-Proteine deutliche Proteinflecke auftraten.


MOLECULAR WEIGHT (x 10⁻⁴)
MOBILITY
L2
S2
S3
S4
L3
L4
L1
S7
L5
S5
L10
L16
L17
L6
L11
S13
L18
L20
L13
L15
L9
S20
L27
S9
S15
S8
L14
L21
L24
L19
L22
S19
L23
L25
L32
L33

1


S2
L1
L2
L4
L3
S3
L5
S4
L7
L12
S6
L8
L9
L10
L11
S7
S5
L6
S8
L13
L15
L14
L17
L16
S10
L18
S9
L19
S11
L21
L22
L20
L23
S13
S12
L25
L24
S14
S15
S16
S18
S19
S17
S20
L27
L28
L29
L30
S21
L31
L32
L33
E.COLI K 70S
L34

a

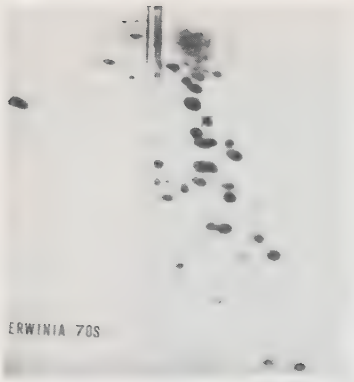
E.COLI K 50S

b

E.COLI K 30S

c

2


ERWINIA 70S

a

ERWINIA 30S

b

ERWINIA 50S

c

AEROBACTER 70S

d

AEROBACTER 30S

e

AEROBACTER 50S

f

SERRATIA 70S

g

SALMONELLA 70S

h

E. FREUNDII 70S

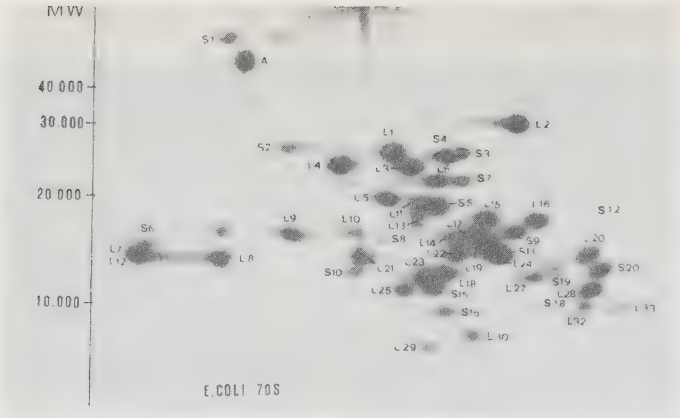
SHIGELLA 70S

j

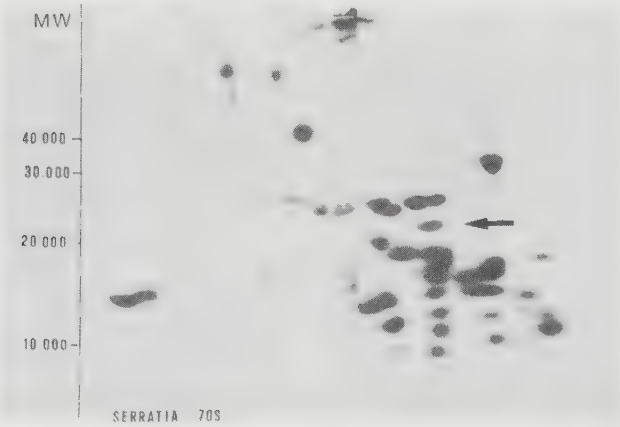
PROTEUS 70S

k

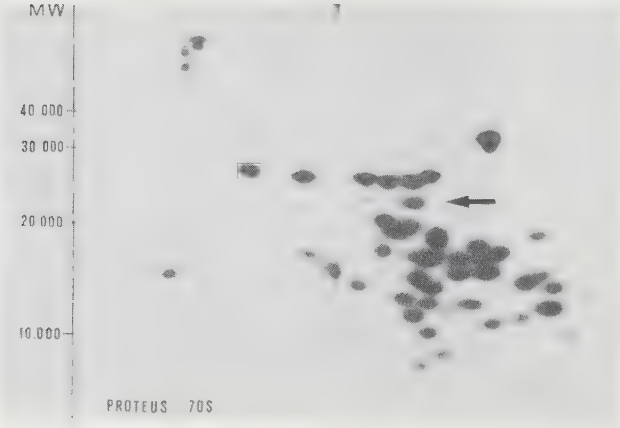
3


MW
40 000
30 000
20 000
10 000
E.COLI 70S

4

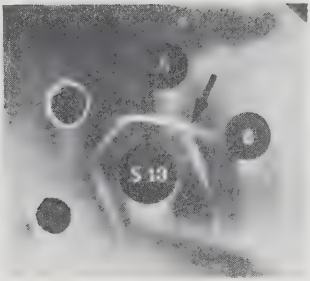

MW
40 000
30 000
20 000
10 000
SERRATIA 70S

a

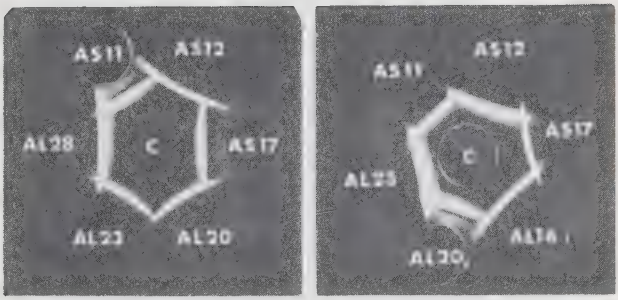

MW
40 000
30 000
20 000
10 000
PROTEUS 70S

b

5



6

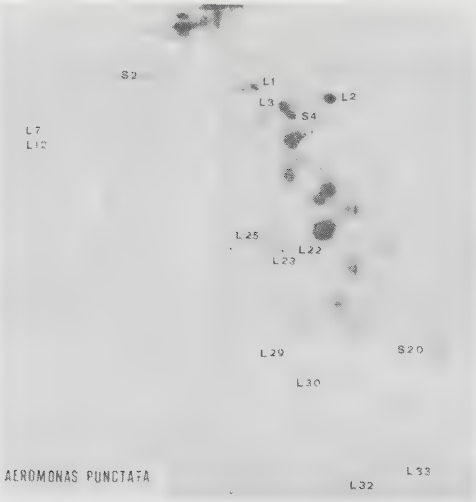


a b

7

PLESIOMONAS SHIGELLOIDES

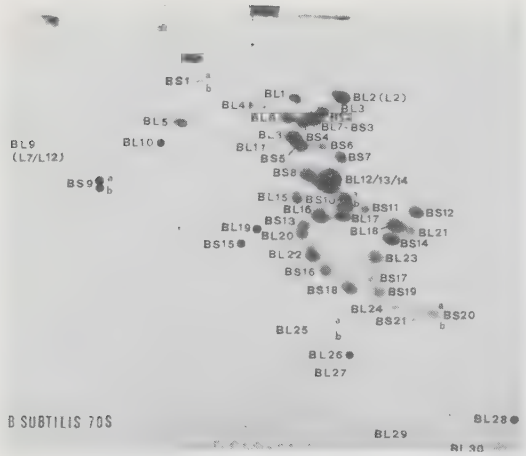
8


S2
L1
L3
L2
S4
L7
L12
L25
L22
L23
L29
S20
L30
AEROMONAS PUNCTATA
L33
L32

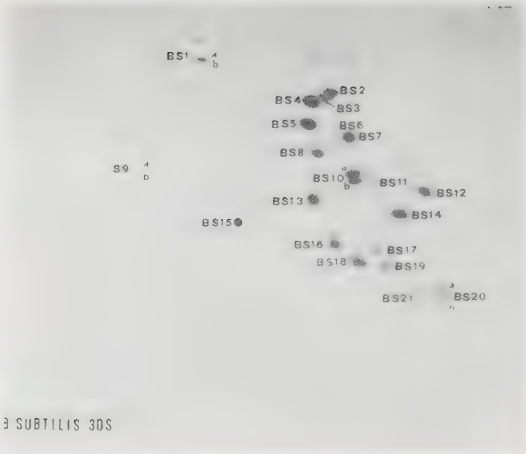
9

L2
VIBRIO CUNEATUS

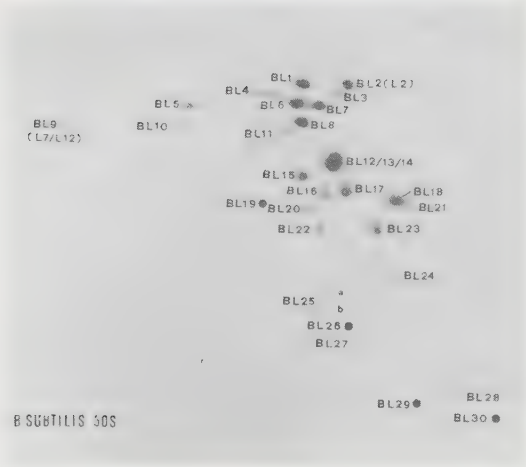
10


BS1
BL1
BL2 (L2)
BL4
BL3
BL5
BL7 - BS3
BS4
BL9
(L7/L12)
BL10
BL17
BS6
BS5
BS7
BS8
BL12/13/14
BS9
BL15
BS10
BL16
BS11
BS12
BS13
BL17
BL19
BL18
BL21
BL20
BS14
BS15
BL22
BL23
BS16
BS17
BS18
BS19
BL24
BS20
BS21
BL25
BL26
BL27
B SUBTILIS 70S
BL28
BL29
BL 30

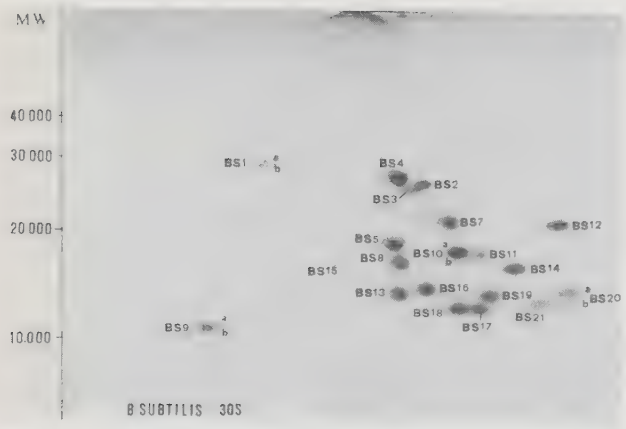
11


BS1
BS2
BS4
BS3
BS5
BS6
BS7
BS8
BS9
BS10
BS11
BS12
BS13
BS14
BS15
BS16
BS17
BS18
BS19
BS21
BS20
B SUBTILIS 30S

a


BL1
BL2(L2)
BL4
BL3
BL5
BL6
BL7
BL9
(L7/L12)
BL10
BL11
BL8
BL12/13/14
BL15
BL16
BL17
BL18
BL19
BL20
BL21
BL22
BL23
BL24
BL25
BL26
BL27
BL29
BL28
BL30
B SUBTILIS 30S

b


MW
40 000
30 000
20 000
10.000
BS1
BS4
BS2
BS3
BS7
BS12
BS5
BS8
BS10
BS11
BS15
BS14
BS13
BS16
BS19
BS20
BS18
BS21
BS17
BS9
B SUBTILIS 30S

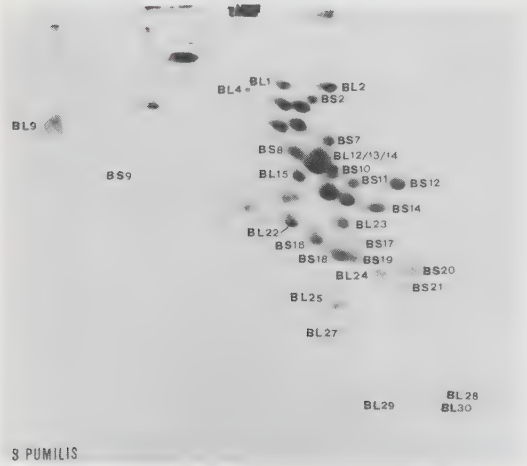
a

MW
40.000
30.000
20 000
10.000
BL1
BL2
BL5
BL3
BL4
BL7
BL11
BL8
BL5
BL12/13/14
BL20
BL23
BL18
BL9
BL10
BL21
BL19
BL15
BL17
BL22
BL24
BL25
BL26
BL27
B.SUBTILIS 50S

b

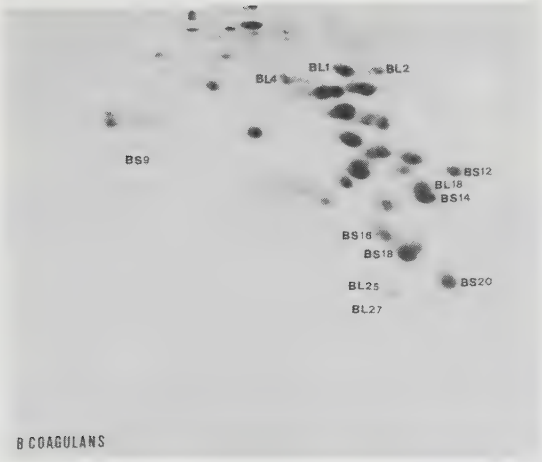
BL1
BL2
BL4
BL3
BL6
BS2
BL5
BS4
BL7
BS3
BL11
BS6
BS7
BS8
BL12/13/14
BS9
BL15
BS10
BS11
BS12
BL19
BL18
BS15
BL22
BS14
BS16
BS17
BS18
BS19
BL24
BS20
BL25
BS21
BL27
BL29
BL28
BL30
B. LICHENIFORMIS

a


BL1
BL4
BL2
BS2
BL9
BS7
BS8
BL12/13/14
BS9
BL15
BS10
BS11
BS12
BS14
BL23
BL22
BS18
BS17
BS18
BS19
BL24
BS20
BS21
BL25
BL27
BL29
BL28
BL30
S PUMILIS

b

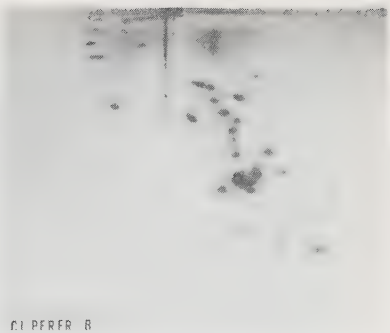
B.CIRCULANS



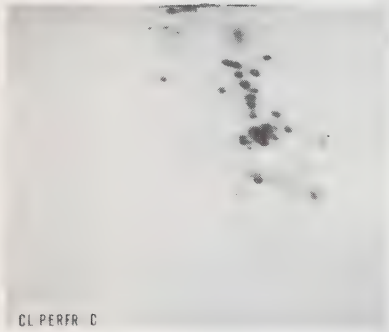
B.COAGULANS

d

a

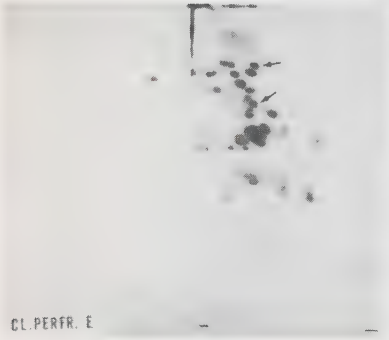


b



c

d



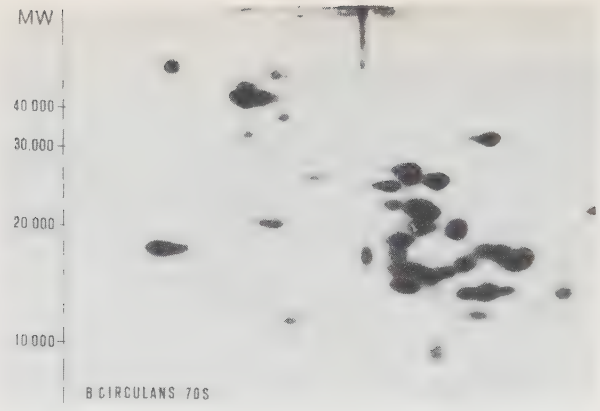
e

f

15

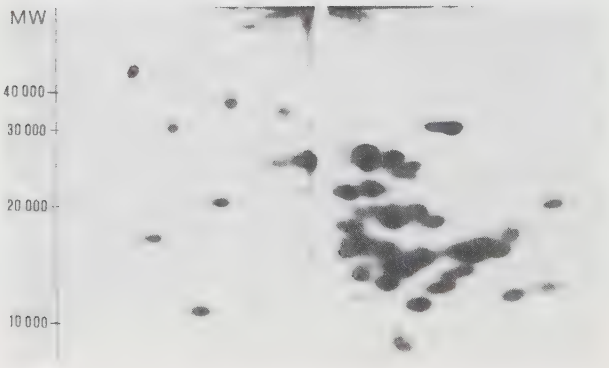
a

b



a

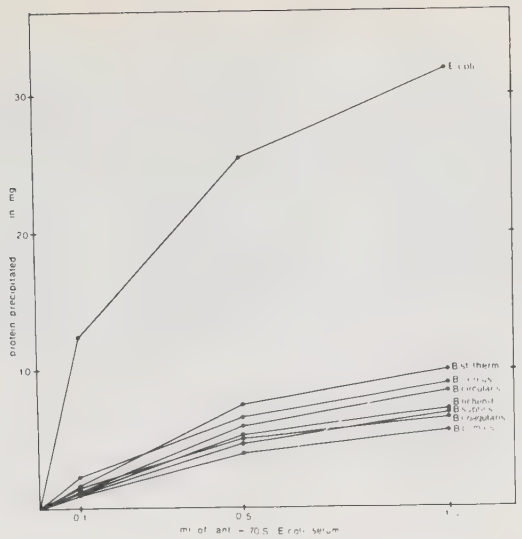
b



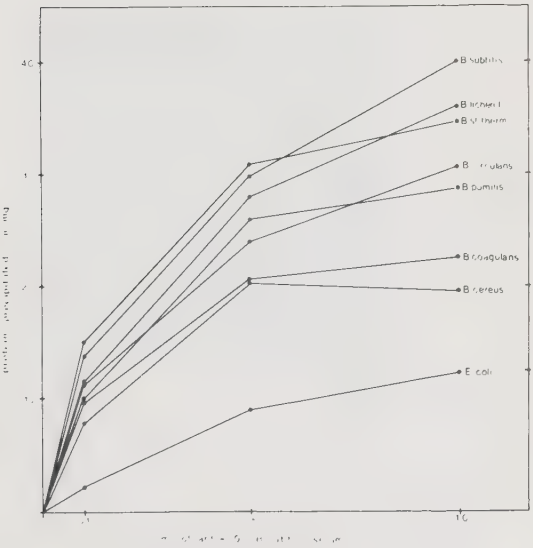
B.CEREUS 70S

c

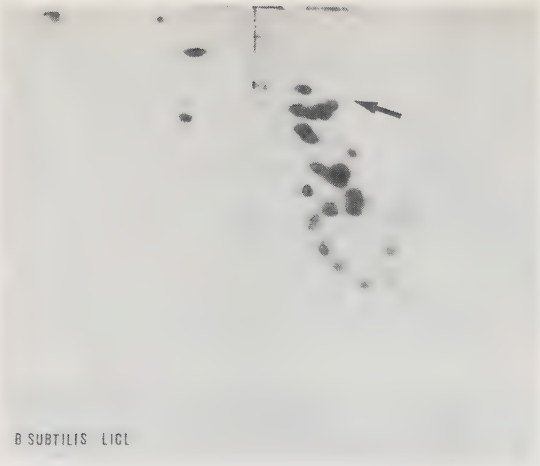
17


protein precipitated in mg
30
20
10
0.1
0.5
E coli
B.st therm
B. circulans
B. subtilis
B. coagulans

a

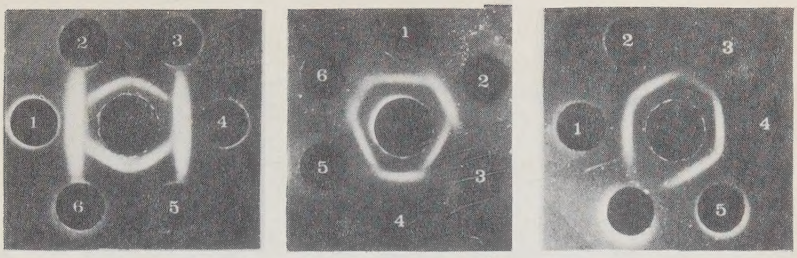

40
B. subtilis
B. stearot
B. st therm
B. circulans
B. pumilis
B. coagulans
B. cereus
E. coli

b

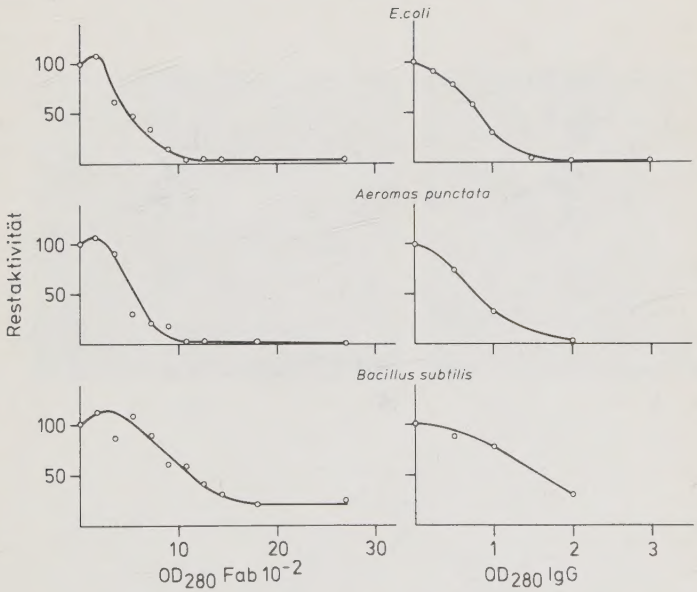


19

20


1
2
3
4
5
6
a
b
c

21


E.coli
Aeromas punctata
Bacillus subtilis
Restaktivität
100
50
10
20
30
1
2
3
OD280 Fab 10-2
OD280 IgG

22

a

b

c

d

23